

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Mise au point d'un modèle d'infection expérimentale
d'entérite nécrotique clinique chez le poulet de chair par
des facteurs prédisposants**

par

Mathieu Bélanger

Département des sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présentée à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

décembre, 2008

© Mathieu Bélanger, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

Mise au point d'un modèle d'infection expérimentale d'entérite nécrotique clinique chez le
poulet de chair par des facteurs prédisposants

présenté par
Mathieu Bélanger

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Serge Messier, président-rapporteur
Martine Boulianne, directrice de recherche
Ann Letellier, codirectrice
Pierre Hélie, membre du jury



Résumé

Cette étude a permis de développer des outils permettant l'évaluation des alternatives aux promoteurs de croissance antimicrobiens pour prévenir l'entérite nécrotique chez le poulet de chair. Un modèle d'infection expérimentale évaluant une co-infection par *Eimeria* et une alimentation à haute teneur en blé comme facteurs prédisposant à l'entérite nécrotique a été élaboré. Des poulets ont été répartis en 5 groupes : trois groupes nourris avec des moulées composées à 45%, 35% ou 25% de blé et 2 groupes nourris d'une moulée à 35% de blé ont reçu en plus 40 ou 24 fois la dose recommandée d'un vaccin anticoccidien constitué d'oocystes vivants d'*Eimeria*. Les poulets ont été inoculés à répétition, *per os*, avec un mélange de 3 isolats de *Clostridium perfringens* provenant de cas cliniques. Suite à ces inoculations, des observations de signes cliniques et scores lésionnels ont été effectuées. Seuls les groupes ayant reçu des *Eimeria* ont démontré des signes cliniques d'entérite nécrotique et lésions macroscopiques au jéjunum. De plus, le contenu du jéjunum, de l'iléon et des caeca a été récupéré pour dénombrer les coliformes thermotolérants, *Lactobacillus*, *C. perfringens* et les bactéries aérobies. Au 2^e jour post-inoculation, les dénombrements de *C. perfringens* dans le jéjunum ont augmenté significativement comparé à son contrôle pour le groupe ayant reçu 24 fois la dose d'anticoccidiens. Des variations des dénombrements ont aussi été observées dans les caeca pour les espèces bactériennes sélectionnées. En accord avec les études antérieures, la vaccination à de fortes doses d'*Eimeria* combinée à une alimentation riche en blé prédisposent à l'entérite nécrotique et des modifications de l'épithélium et de la flore intestinale sont observées suite à l'infection. Ce modèle pourra servir à évaluer des alternatives aux antibiotiques utilisés en continu pour prévenir efficacement l'entérite nécrotique.

Mots-clés : Poulet, entérite nécrotique, *Clostridium perfringens*, modèle expérimental, *Eimeria*, blé, microflore

Abstract

This study was conducted to develop tools for the evaluation of alternatives to antimicrobial growth promoters to prevent necrotic enteritis in broiler chickens. A *Clostridium perfringens* infection model was carried out to assess the role of *Eimeria* infection and high wheat feed content as predisposing factors in broiler chickens for necrotic enteritis. Chickens were divided into 5 groups: Three groups were fed with a 45%, 35% or 25% wheat diet and 2 groups were fed with a 35% wheat diet with a 40 or 24 times the recommended dose of a live *Eimeria* vaccine. Chickens were challenged *per os* with a mixture of 3 *Clostridium perfringens* isolated from clinical cases. After challenge, clinical signs were observed and macroscopic lesion scoring was carried out. Only groups which received the *Eimeria* vaccine showed clinical signs and macroscopic lesions in the jejunum corresponding to clinical necrotic enteritis. Furthermore, the jejunum, ileum and cecal contents were collected for fecal coliforms, *Lactobacillus*, *C. perfringens* and total bacteria counts. On day 2 post-inoculation, *C. perfringens* counts in jejunum from the group receiving 24 times the anticoccidial dose were higher than the control group. Important variations in counts were shown in cecum for the bacterial species that were studied. *Eimeria* infection with high wheat content in the meal predisposed broiler chickens to necrotic enteritis and that intestinal microflora modifications are observed after *C. perfringens* challenge. This model can be used to assess antimicrobial growth factors alternatives for preventing necrotic enteritis.

Keywords: Chickens, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, infection model, *Eimeria*, wheat, microflora,

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements	x
Introduction	1
Chapitre 1. Recension de la littérature	3
1.1. Système digestif aviaire	3
1.2. Flore intestinale aviaire	4
1.2.1. Techniques pour l'examen de la microflore.....	5
1.2.2. Constitution et évolution de la flore.....	6
1.2.3. Rôle de la flore intestinale pour l'hôte	7
1.3. Étiologie de l'entérite nécrotique	10
1.3.1. Caractérisation de l'agent infectieux.....	11
1.3.2. Facteurs prédisposants	14
1.3.3. Intégration des modèles expérimentaux.....	17
1.4. Description de l'entérite nécrotique	19
1.4.1. Signes cliniques externes	19
1.4.2. Forme sous-clinique	20
1.4.3. Lésions macroscopiques et nécrose	21
1.5. Stratégies prophylactiques contre l'entérite nécrotique aviaire	22
1.5.1. Contrôle des facteurs prédisposants	22
1.5.2. Promoteurs de croissance antimicrobiens	22
1.5.3. Alternatives aux promoteurs de croissance antimicrobiens	23
Chapitre 2. Évaluation <i>in vitro</i> des traitements alternatifs contre l'entérite nécrotique.....	27

2.1. Résumé.....	27
2.2. Introduction.....	27
2.3. Méthodologie	28
2.3.1. Traitements.....	28
2.3.2. Concentration minimale inhibitrice en microplaque.....	28
2.4. Résultats	29
2.5. Discussion	31
Chapitre 3. Article: Assessment of <i>Eimeria</i> and Wheat Feed to Induce Experimental Necrotic Enteritis and their Impact on the Intestinal Microflora of Broiler Chickens.....	32
INTRODUCTION	36
MATERIALS AND METHODS.....	37
RESULTS	42
DISCUSSION	45
REFERENCES.....	49
ACKNOWLEDGMENTS	52
TABLES.....	53
ILLUSTRATIONS.....	60
Discussion	64
Conclusion	69
Bibliographie.....	70

Liste des tableaux

Chapitre 3

Table 1. Evaluation of <i>C. perfringens</i> (mix inoculum) strains alpha toxin production <i>in vitro</i>	53
Table 2. Mean total score of microscopic intestinal lesions on inoculation day (Day I) after <i>C. perfringens</i> inoculation, day 2 (Day 2 PI) and 9 (Day 9 PI) post <i>C. perfringens</i> inoculation for various groups.....	54
Table 3. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of <i>C. perfringens</i> (Cp), lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from jejunum contents, 2 days post <i>C. perfringens</i> inoculation when assessing wheat content effect.	55
Table 4. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of <i>C. perfringens</i> (Cp), Lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from jejunum contents, 2 days post <i>C. perfringens</i> inoculation when assessing <i>Eimeria</i> effect.....	56
Table 5. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of <i>C. perfringens</i> (Cp), Lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from cecal contents, 2 days post <i>C. perfringens</i> inoculation when assessing wheat content effect.	57
Table 6. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of <i>C. perfringens</i> (Cp), Lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from cecal contents, 2 days post <i>C. perfringens</i> inoculation when assessing <i>Eimeria</i> effect.....	58
Table 7. Pulse field gel electrophoresis of <i>C. perfringens</i> strains isolated during the trial.....	59

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Représentation schématique de la structure de l'alpha toxine sécrétée par *C.*

perfringens (Flores-Diaz et al., 2004).....12

Chapitre 2

Figure 1 : Pourcentage de croissance en présence de différentes concentrations d'OléobiotecTM volaille pour *C. perfringens* (gris uni) et *E. coli* (noir rayé) à 8h.....30

Figure 2 : Pourcentage de croissance en présence de différentes concentrations de GalliacidTM pour *C. perfringens* (gris uni) et *E. coli* (noir rayé) à 8h.....30

Chapitre 3

Fig. 1. Necrosis of chicken jejunal mucosa on the second day post inoculation in groups receiving coccidial vaccine and *Clostridium perfringens* inocula.....60

Fig. 2. CE SSCP dendrogram of pooled fecal material samples from group D (yellow) and its control group B (green) on day of *C. perfringens* inoculation.....61

Fig. 3. CE SSCP dendrogram of pooled fecal material samples from group D (yellow) and its control group B (green) on the second day after the first *C. perfringens* inoculation.....62

Fig. 4. PFGE of *C. perfringens* isolates 2003-1256 (profile 1), 2006-4758 (profile 2), SHY07 383 (profile 3) and isolate PF14d sampled from environment prior to the first *C. perfringens* inoculation (profile 4).....63

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AO	Acides organiques
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
AMB	Aerobic mesophilic bacteria
CE SSCP	Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism
TC	Thermoresistant coliforms
CFU	Colony forming unit
Cp	<i>Clostridium perfringens</i>
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EN	Entérite nécrotique
HE	Huiles essentielles
LB	Lactobacilli
NE	Necrotic enteritis
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PLC	Phospholipase C
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
UFC	Unités formatrice de colonies

Remerciements

Je tiens à remercier Dre Martine Boulianne, directrice, Dre Ann Letellier, co-directrice et Dr Philippe Fravallo pour leur aide précieuse dans plusieurs aspects de ma maîtrise ainsi que pour leurs judicieux conseils.

Un remerciement distingué à tous les membres de la chaire de recherche en salubrité des viandes de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal qui m'ont aidé dans les aspects techniques de ma maîtrise et particulièrement Alexandre Thibodeau qui a participé à la réalisation du modèle en France. Je remercie Ghislaine Roch et Dr Robert Gauthier pour leur collaboration au projet.

Je remercie aussi les membres des unités UHQ PAP et UVIPAC de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments de Ploufragan/Plouzané. Remerciements spéciaux à Françoise Lalande et Maryline Queguiner pour leur support technique, à Jean Michel Repérant pour son expertise en pathologie et parasitologie, à Michel Amelot pour la coordination des animaliers, enfin à Gilles Salvat pour nous avoir autorisé à utiliser les installations de niveau de sécurité 2 du site de l'AFSSA Ploufragan.

Je remercie également mes proches et ma famille pour leur soutien.

Finalement, je remercie les organismes subventionnaires tel que le CORPAQ et le Département des sciences cliniques de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour leur généreuse contribution.

Introduction

Les professionnels de l'industrie avicole reconnaissent l'importance de l'entérite nécrotique (EN) pour son incidence sur les performances des élevages aviaires et ce, à l'échelle planétaire. La maladie cause divers degrés de dysfonctions intestinales pouvant entraîner la mort du poulet. Ces dysfonctions se traduisent en une baisse de rendements des élevages et occasionnent un impact économique important sur l'industrie. La mauvaise conversion alimentaire et un ralentissement du gain de masse corporelle semblent être à l'origine de cet impact (Lovland et Kaldhusdal, 2001).

Depuis la fin des années 70, des chercheurs étudient l'action de divers antibiotiques comme la bacitracine et la virginiamycine dans le traitement et la prévention de l'EN (Dumonceaux et al., 2006; Prescott et al., 1978). Via différents mécanismes d'action, ils ont un effet inhibiteur sur la prolifération des *Clostridium perfringens* colonisant le système digestif. Les résultats de ces études suggèrent une utilisation prophylactique de ces antibiotiques comme moyen de contrôle de l'EN. À la lumière de ces résultats, l'industrie agroalimentaire utilise ceux-ci comme promoteurs de croissance et les administre en continu dans l'alimentation des oiseaux. Cependant, l'utilisation massive de ces promoteurs de croissance permet la sélection de bactéries avec des mécanismes de résistance contre ces antibiotiques (Dibner et Richards, 2005). Cette situation s'avère problématique et peut permettre le transfert de résistance à d'autres bactéries pathogènes.

Suite aux pressions des consommateurs et pour contrer le développement d'antibiorésistance, les gouvernements européens ont exigé le retrait de certains promoteurs de croissance de l'alimentation des troupeaux durant les années 80-90. Suite à ce retrait, les producteurs européens ont observé une recrudescence de l'EN au sein des élevages, particulièrement au Royaume Uni et dans les pays scandinaves (Van Immerseel et al., 2004). Par exemple, la Norvège a vu une forte incidence d'EN lors du retrait des antibiotiques administrés en continu au cours des années 1987 à 1989 et 1995 -1996 (Lovland et Kaldhusdal, 1999). En 2001, une étude est réalisée au Royaume-Uni sur

l'incidence de l'EN. Sur près de 600 répondants, 12,3% de ceux-ci ont connu une épisode d'EN au cours de leur dernier cycle de production (McDevitt et al., 2006).

Inspirés par cette action européenne, certains organismes et restaurateurs canadiens et québécois souhaitent le retrait des promoteurs de croissance de l'alimentation des poulets de chair. Face à cette situation, il existe une possibilité de recrudescence de l'EN dans les productions de poulets de chair au Canada. Il y a donc nécessité de développer un modèle d'infection expérimentale reproductible d'EN constitué de facteurs prédisposant à la pathogénie, afin d'évaluer l'efficacité d'alternatives aux promoteurs de croissance antimicrobiens à prévenir efficacement l'EN.

L'objectif principal du projet était de développer un modèle d'infection expérimentale d'EN caractéristique des cas de terrain chez le poulet de chair incluant une co-infection de coccidies d'*Eimeria* et une alimentation à haute teneur en blé comme facteurs prédisposants à l'EN.

Chapitre 1. Recension de la littérature

1.1. Système digestif aviaire

L'appareil digestif des oiseaux présente des caractéristiques anatomiques particulières. L'activité digestive commence au niveau de la cavité buccale par la formation du bol alimentaire et se poursuit dans l'oesophage. À ce niveau, l'ingesta est mis en réserve dans le jabot qui est une poche en dérivation sur l'oesophage (Brugère-Picoux et Silim, 1992), s'ensuit le proventricule puis le gésier. Le proventricule sécrète les acides et le suc gastrique. Le gésier broie le contenu, remplaçant ainsi l'absence de mastication chez les oiseaux, et mélange le suc gastrique avec le bol alimentaire. La digestion par le suc gastrique continue dans les intestins. L'activité gastrique continue au travers de la boucle duodénale avant de croiser l'embouchure du canal pancréatique et biliaire situé à la fin du duodénum (Brugère-Picoux et Silim, 1992). Les sécrétions pancréatique, biliaire et intestinale (glandes de Lieberkühn) sont constituées d'enzymes lytiques qui permettent la digestion de l'ingesta et l'absorption des glucides, lipides et peptides à travers les différentes sections de l'intestin : le duodénum, le jéjunum, l'iléum, les caeca et le côlon. Le côlon est court et terminé par le cloaque. Il sert à l'absorption de l'eau et des électrolytes chez le poulet. Les caeca sont les principales poches de fermentation chez les oiseaux. Les nutriments sont absorbés par la muqueuse intestinale du tube digestif (Leeson et al., 1985). La muqueuse couvre l'intestin avec ses villosités et cryptes. À la surface des villosités se trouvent les microvillosités, dont la configuration augmente la surface de contact pour amplifier l'absorption. En plus de l'absorption de nutriments provenant d'aliments digérés, les cellules épithéliales de l'intestin représentent la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Ces dernières ont un cycle de régénération continu. Sous l'épithélium se trouve la *lamina propria* qui comprend du tissu lymphoïde et des vaisseaux sanguins. Le tissu lymphoïde de la *lamina propria* comportent des lymphocytes, des plasmocytes, des macrophages et des éosinophiles (Leeson et al., 1985). Ces cellules forment le système lymphoïde associé à l'intestin et créent une barrière de protection entre les organes de l'hôte et les agents pathogènes. La muqueuse sécrète aussi des immunoglobulines A

dimériques pour l'immunité locale de l'intestin dirigés contre les microorganismes envahisseurs.

1.2. Flore intestinale aviaire

La flore intestinale normale du poulet, comme celle de toute autre espèce animale, est abondante et diversifiée. La littérature suggère que cette microflore est constituée d'une multitude d'espèces minoritaires dont plusieurs d'entre elles ne sont pas encore caractérisées (Holben et al., 2004). Celles-ci évoluent spatio-temporellement à travers le tube digestif (Wielen et al., 2002). En général, les bactéries anaérobiques à Gram positif dominent la microflore du système gastrointestinal. Plus précisément, les lactobacilles colonisent majoritairement la partie proximale de l'intestin et une microflore anaérobie plus dense et diversifiée colonise le caecum (Amit-Romach et al., 2004; Barnes et al., 1972; Lan et al., 2002).

Plusieurs chercheurs ont étudié l'écologie microbienne du caecum à l'aide de cultures bactériologiques (Barnes, 1979; Barnes et Impey, 1972; Barnes et al., 1972; Mead et Adams, 1975). Cependant, ces méthodes parfois laborieuses ne permettaient pas nécessairement l'identification ou la quantification de la totalité des espèces composant la microflore du caecum.

La biologie moléculaire offre maintenant aux chercheurs de nouvelles technologies facilitant la détection et la caractérisation des microorganismes non cultivables par des méthodes traditionnelles. Ainsi la sensibilité et la spécificité qu'offrent l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (Kharreborg et al., 2002), la réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (Wise et Siragusa, 2007), le polymorphisme de conformation d'ADN simple brin (Hong et al., 2007; Zinger et al., 2007), l'électrophorèse à champ pulsé (Chalmers et al., 2008) ou le polymorphisme de longueur de fragment de restriction (Gong et al., 2002) permettent maintenant une étude plus approfondie de l'écologie microbienne intestinale du poulet.

1.2.1. Techniques pour l'examen de la microflore

Voici décrites plus en détail des techniques moléculaires permettant une caractérisation plus spécifique de la microflore intestinale.

1.2.1.1. PCR niché

La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est une réplication *in vitro* de séquences d'ADN par un ADN polymérase (Mullis et al., 1986; Mullis et Faloona, 1987). La réplication de séquences ciblées d'ADN variables entre les espèces comme des régions du gène de l'ARNr 16S permet une meilleure estimation de la diversité microbienne (Lan et al., 2002; Marchesi et al., 1998). La PCR niché varie par l'utilisation de 2 paires d'amorces. Une première amplification dite tampon augmente le nombre de séquences incluant la région ciblée, amplifiées avec une seconde paire d'amorce (Miwa et al., 1999; Miwa et al., 1998). Cette technique amplifie des séquences qui, avec une simple polymérisation, seraient faiblement amplifiables.

1.2.1.2. Polymorphisme à conformation simple brin

La technique de polymorphisme à conformation simple brin analyse la mobilité d'un simple brin d'ADN lors d'électrophorèse au travers un capillaire. Les variations de vitesse de migration sont liées aux modifications de la structure secondaire ou tertiaire de l'ADN simple brin. La mobilité de fragments d'une séquence spécifique d'ADN est comparée et traduite à l'aide de programmes informatisés (Baba et al., 2003; Peters et al., 2000; Schwieger et Tebbe, 1998; Widjoatmodjo et al., 1995).

1.2.1.3. Électrophorèse à champ pulsé

Ce type d'électrophorèse a été mis au point afin de séparer les grands segments d'ADN selon leur taille, ce qui est impossible par une électrophorèse classique sur un gel

d'agarose. Le principe de l'électrophorèse à champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique dans le temps. La réorientation alternative du champ électrique change la trajectoire de la molécule d'ADN de façon à augmenter la probabilité qu'elle passe à travers les mailles du gel (Barbara et al., 2008; Chalmers et al., 2008).

1.2.2. Constitution et évolution de la flore

L'édification de la microflore entérique du poulet est influencée par la composition des intrants alimentaires ingérés par l'hôte. Les bactéries du tractus gastrointestinal obtiennent une partie de leur énergie des nutriments provenant de la consommation alimentaire de la volaille. Ces nutriments lentement assimilés ou non métabolisés par l'oiseau vont définir la composition du bolus alimentaire ainsi que la microflore entérique du poulet (Apajalahti et al., 2004). L'impact de la diète peut être facilement observé sur la structure et la diversité de cette flore (Apajalahti et al., 2001; Bedford et Apajalahti, 2000, 2001) et ce, dès les premiers instants post éclosion.

Certains auteurs observent la présence de microorganismes uréolytiques anaérobies facultatifs quelques heures suivant l'éclosion du poussin (Barnes, 1979; Barnes et Impey, 1972; Mead et Adams, 1975). Cette flore hétéroclite se métamorphose constamment suivant le développement du poulet puis se stabilise et colonise des zones distinctes du tube digestif du poulet.

Des chercheurs ont isolé des entérobactéries, des entérocoques tel *E. faecalis* et *E. faecium*, des lactobacilles et des clostridies provenant d'échantillons intestinaux de poulets de moins de 4 jours d'âge (Mead et Adams, 1975). Dès la première semaine, des entérobactéries et des lactobacilles dominent le gésier, le duodénum, le jéjunum et l'iléon tandis que la flore du caecum est majoritairement composé de coliformes, d'entérocoques et de lactobacilles (Barnes et al., 1972; Wielen et al., 2000). *Clostridium perfringens* est aussi présent et abondant dans le caecum lors des premiers jours. Près de 15% des séquences d'ADN_{16S} provenant du caecum sont homologues à celle de *C. perfringens* à 3

jours d'âge (Lu et al., 2003). *C. perfringens* est l'agent infectieux de l'entérite nécrotique. À 7 jours d'âge, les souches de *C. saccharolyticum*, de *C. oroticum* et de *C. orbiscindens* remplacent les souches initiales de la population du caecum (Lu et al., 2003). Entre la 2^e et 6^e semaine, les *C. perfringens* sont isolés chez une minorité de volaille saine et se dénombrent sous les 10⁴ UFC/g dans le petit intestin incluant le jéjunum (Barnes et al., 1972).

L'établissement de la flore typique adulte du petit intestin débute dès la deuxième semaine post éclosion. Le caecum et l'iléon ont chacun leur communauté microbienne distincte et varie selon l'alimentation des oiseaux (Torok et al., 2008). La partie supérieure de l'intestin est dominée par les lactobacilles. La flore cécale adulte est dominée par des anaérobies strictes (Amit-Romach et al., 2004). Pour l'iléon, des séquences d'ADN_r16S de *Lactobacilli acidophilus*, *Clostridium*, *Streptococcus* et *Enterococcus* composent en grande partie la librairie génomique de l'iléon de la 1^{ère} à la 3^e semaine. La composition de la flore de l'iléon varie peu au cours du temps et ce même si la diète du poulet change selon les étapes de sa croissance (Lu et al., 2003). Les *Clostridiaceae* se révèlent être les principaux microorganismes de la communauté bactérienne du caecum selon des analyses génotypiques et ce pour chaque groupe d'âge (Lu et al., 2003). Les *Ruminococcus* représentent le genre le plus abondant de la population des *Clostridiaceae* dans le caecum (Lu et al., 2003). La présence de bifidobactéries dans le caecum est observée dès la 3^e semaine d'âge et persiste jusqu'à maturité de l'oiseau (Amit-Romach et al., 2004; Barnes et al., 1972).

1.2.3. Rôle de la flore intestinale pour l'hôte

La microflore intestinale commensale influe énormément sur le métabolisme du système digestif de l'hôte. Elle exerce une action prophylactique contre la colonisation des bactéries pathogènes en plus de contribuer au développement et à la performance

zootechnique de l'animal. Certes, cette relation commensale implique quelques impacts physiologiques mais somme toute, la symbiose comble les bactéries commensales et l'hôte.

Le principal bénéfice que l'hôte acquiert de sa flore indigène intestinale est la résistance à la colonisation du tube digestif par les agents pathogènes. Des travaux appuient cette hypothèse en démontrant que les animaux gnotobiotiques exempt de germes sont plus susceptibles à la colonisation par des agents pathogènes que ceux des élevages conventionnels (Harp et al., 1992; Wells et al., 1988). Nurmi et Rantala ont appelé ce phénomène la compétition exclusive (Nurmi et al., 1992; Patterson et Burkholder, 2003). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une rivalité entre les bactéries pour les sites spécifiques d'attachement de la muqueuse intestinale (Ma et al., 2006; Ragione et Woodward, 2003), la libération de composés antimicrobiens dans l'écosystème intestinal comme des acides organiques et des bactériocines (Jack et al., 1995; Wielen et al., 2000), la composition de la diète (Torok et al., 2008) et la stimulation du système immunitaire (Hara et al., 2003).

La compétition exclusive mucosale est basée sur la capacité de la microflore indigène d'occuper les sites d'attachement de la muqueuse réduisant ainsi l'adhésion des agents pathogènes et la colonisation par ceux-ci. Il est démontré que certaines espèces de lactobacilles possèdent une plus grande affinité pour les glycoprotéines de la muqueuse en comparaison à des sérovars de *Salmonella* et *E. coli* (Ma et al., 2006). La divergence d'affinité aux sites d'attachement de la muqueuse entre ces espèces favorise l'établissement des lactobacilles et entrave la colonisation des bactéries non indigènes réduisant ainsi les risques de bouleverser l'homéostasie. L'inoculation de spores de *Bacillus subtilis* s'est aussi révélée efficace à réprimer la colonisation de *Salmonella enteritidis* et *C. perfringens* chez les poulets (Ragione et Woodward, 2003). À noter que les isolats provenant de microflores intestinales semblent préférables aux traitements commercialisés à base de souches bactériennes définies pour lutter contre les agents pathogènes et ce, indépendamment de l'hydrophobicité des souches (Ragione et Woodward, 2003).

En plus d'occuper les sites d'attachement de la muqueuse, la microflore intestinale procure bon nombre de nutriments comme des acides aminés, vitamines et acides gras volatils à l'hôte. Le système digestif utilise en partie ces acides tels le lactate, l'acétate, le propionate et le butyrate provenant du métabolisme des sucres (Barnes, 1979; Wielen et al., 2000) comme source d'énergie (Hegde et al., 1982). L'activité métabolique des acides gras à courte chaîne est associée à des fonctions gastro-entériques comme la stimulation des nerfs et des muscles actionnant la motilité intestinale, la prolifération des cellules ainsi que le renouvellement de la muqueuse intestinale (Nava et al., 2005). De plus, ces acides contribuent au maintien de la flore intestinale (Hara et al., 2003; Wielen et al., 2000). Chez le porc, les acides organiques stimulent la fermentation bactérienne et modulent la microflore (Piva et al., 2002) favorisant ainsi l'intégrité du système digestif. Toutefois, l'activité inhibitrice des acides gras est insuffisante pour inhiber la colonisation intestinale des agents pathogènes (Su et al., 1987) qui peuvent s'adapter dans des conditions de stress (Bearson et al., 1997). Ceci implique que l'action d'autres composés comme les bactériocines contribuent à la compétition exclusive.

Les bactériocines sont des agents protéiques ayant une activité bactéricide à spectre réduit (Jack et al., 1995). Les bactériocines contribuent à inhiber la colonisation intestinale de quelques agents pathogènes. Certains membres des *Enterobacteriaceae* (Abercrombie et al., 2006) et des bactéries lactiques (Callewaert et al., 1999; Chumchalova et al., 2004; Deraz et al., 2005; Leroy et al., 2006) sécrètent des bactériocines. Les composés sécrétés par les bactéries lactiques ont généralement un spectre d'action restreint aux bactéries à Gram positif phylogénétiquement près du microorganisme sécréteur et peu ou pas d'effets contre celles à Gram négatif (Jack et al., 1995).

Bien que la microflore commensale occupe les sites d'attachement de la muqueuse et procure des nutriments, elle stimule aussi les défenses immunitaires spécifique et non spécifique de l'hôte (Cebra, 1999) servant à le protéger non seulement de l'intrusion des agents infectieux mais aussi d'une croissance excessive de la microflore intestinale. La

flore module la formation de la muqueuse qui tapisse et préserve l'épithélium gastro-intestinal en agissant comme une barrière. La microflore module aussi la réponse immunitaire modifiant le développement des cellules B et T (Jiang et al., 2004), l'activité des macrophages, le titre des anticorps, la libération des interférons et interleukines. Ceci contribue à la suppression des agents infectieux (Nava et al., 2005). Pour empêcher une activité permanente du système immunitaire due à la présence constante de la microflore intestinale, on suggère que la stimulation continue du centre germinal est atténuée par l'hôte qui s'adapte à la présence perpétuelle de ces bactéries (Shroff et al., 1995). Toutefois, l'intensité de la réaction immune dans ce cas est caractérisée par la composition de la communauté bactérienne (Koenen et al., 2004a) et la nature de l'hôte (Koenen et al., 2004b).

La compétition exclusive menée par la flore intestinale en relation avec le système immunitaire de l'hôte contribue à la sauvegarde de l'intégrité intestinale de l'hôte contre l'action des agents pathogènes et leurs toxines.

1.3. Étiologie de l'entérite nécrotique

La relation entre l'hôte et sa flore intestinale, bien que bénéfique, n'est pas sans risque pour l'hôte. Des bactéries dites opportunistes sont constamment présentes chez l'hôte et induisent la pathologie seulement si l'homéostasie gastrointestinale est déséquilibrée. Dans certaines conditions, des bactéries opportunistes traversent la barrière épithéliale résultant en de sérieuses complications pouvant mener à la mort de l'hôte (Farthing, 2004).

Dans les cas d'EN chez le poulet, la bactérie opportuniste a été identifiée par W.E. Parish en 1961 comme étant *Clostridium welchii*, désormais désigné *Clostridium perfringens*. L'induction de dommages à l'épithélium intestinal coïncide avec la présence de cette bactérie en grande quantité. La littérature fait le lien entre la charge de *C. perfringens* et la fréquence des lésions caractéristiques de l'EN (Kaldhusdal et al., 1999).

Ce dernier a besoin cependant de cofacteur pour induire des lésions. Les facteurs prédisposants déséquilibrent l'homéostasie gastrointestinale et favorisent la prolifération de *C. perfringens* jusqu'à des charges de 10^7 - 10^9 UFC/g de digesta résultant en cas cliniques d'EN (Kondo, 1988).

Clostridium perfringens est ubiquitaire, on le retrouve dans l'environnement et le sol. Il peut se propager à l'intérieur des couvoirs, des abattoirs et des plans de transformation (Craven et al., 2003; Van Immerseel et al., 2004). On la retrouve dans la flore d'oiseaux sains (Olkowski et al., 2006) et parfois en concentration élevée dans les fientes d'oiseaux sauvages. Cette espèce serait présente chez 75% à 95% des poulets de chair (Van Immerseel et al., 2004).

1.3.1. Caractérisation de l'agent infectieux

Clostridium perfringens, bactérie à Gram positif, anaérobe stricte, sporulante, peut induire une infection à son hôte. Plus de 800 sérotypes de *C. perfringens* sont connus et 17 différentes toxines et enzymes peuvent en être isolées (Hatheway, 1990; McDonel, 1980). Parmi les toxines, les toxines alpha, bêta, epsilon et iota possèdent une activité létale majeure. En fonction de la production de ces quatre toxines, *C. perfringens* est divisé en 5 types : A, B, C, D et E. *Clostridium perfringens* type A et parfois le type C causent l'EN chez le poulet. Pour les cas cliniques, on observe 1 à 2 souches dominantes de *C. perfringens* associée à la pathologie (Bernier et al., 1977). Le type A produit des quantités importantes de l'alpha toxine en phase de croissance exponentielle et des entérotoxines au moment de la sporulation (Lovland et al., 2004; McReynolds et al., 2004). Pour sa part, le type C produit la toxine alpha et la toxine bêta (McReynolds et al., 2004). Cependant, le gène codant pour la toxine alpha est considéré comme le facteur de virulence majeur pour la maladie parce que les poulets sont approximativement 200 fois plus susceptibles à la toxine alpha que les toxines bêta et epsilon.

Figure 1 : Représentation schématique de la structure de l'alpha toxine sécrétée par *C. perfringens* (Flores-Diaz et al., 2004)



La toxine alpha de *C. perfringens* est une phospholipase C (PLC) et la plus toxique des PLC bactériennes. La toxine alpha est le facteur de virulence majeur pour les souches de type A et C (Hale et Stiles, 1999). La toxine est une métalloenzyme composée de 370 acides aminés dont la structure tridimensionnelle démontre deux domaines liés par une région flexible (Flores-Diaz et al., 2004). Par ces deux régions, la toxine possède une activité lécithinase et sphingomyélinase. L'enzyme peut adopter deux configurations : une ouverte où le site actif est accessible et une fermée où le site actif est caché. Il est suggéré que la fixation du domaine C-terminal de la PLC de *C. perfringens* à la membrane cellulaire de l'hôte induit un changement de conformation dans le domaine N-terminal libérant le site actif (Flores-Diaz et al., 2004). Sous sa forme active, la toxine alpha hydrolyse les phospholipides entraînant une désorganisation membranaire (Rood, 1998; Titball et al., 2000). La toxine hydrolyse la phosphatidylcholine des cellules épithéliales membranaires du tube digestif pour produire du diacylglycérol (McDevitt et al., 2006). Le

diacylglycérol active la protéine kinase C qui stimule la cascade de l'acide arachidonique (Titball et al., 1999) entraînant une réaction inflammatoire. La réaction inflammatoire peut causer une vasoconstriction, l'aggrégation de plaquettes et une dysfonction myocardique menant à la mort du sujet (McReynolds et al., 2004). La destruction de la muqueuse par la toxine alpha se manifeste habituellement au niveau du jéjunum, de l'iléon et même du duodénum (Fukata et al., 1988). La relation causale entre le *C. perfringens* et l'EN est prouvée, cependant il n'est pas encore démontré très clairement que l'EN est associée à la régulation du gène produisant la PLC chez *C. perfringens* de type A (McDevitt et al., 2006). Des molécules de signalisation libérées par la microflore permettant de communiquer et coordonner les comportements des bactéries pourraient régulariser la production de toxines par *C. perfringens*. Ces molécules d'auto-induction s'accumulent dans l'environnement immédiat des *C. perfringens* pouvant déclencher la production de toxines sans que ces toxines soient associées à l'EN (McDevitt et al., 2006). Certaines molécules produites comme la clindamycine auraient la capacité de supprimer l'activité de la toxine alpha (Stevens et al., 1987).

D'autres molécules comme la lécithinase sont produites en phase de croissance exponentielle. Les cultures de *C. perfringens* atteignent la phase stationnaire avant le déclin de sa production (Nord et al., 1974). La souche ATCC 13124 est la plus grande productrice de lécithinase (Mollby et Holme, 1976). Cette dernière, en phase exponentielle, peut avoir une activité amplifiée de 40 fois sur une période de 2 heures (Stevens et al., 1987). La production de lécithinase est optimale à une température de 37 °C et un pH variant de 6 à 7 (Nord et al., 1974). Le type A produit aussi des entérotoxines lors de la sporulation, durant la phase stationnaire (Craven et al., 1981; Labbe, 1981; Varga et al., 2004).

Récemment, des chercheurs ont découvert une nouvelle toxine, la NetB (Keyburn et al., 2008). La toxine NetB a été identifiée d'isolats de *C. perfringens* provenant de poulets atteints d'EN. La toxine NetB montre une activité lytique contre des cellules hépatiques de poulet Leghorn (Keyburn et al., 2008). Cette toxine a des séquences d'acides aminés

similaires aux toxines formant des pores membranaires et semble être un facteur de virulence déterminant dans le développement des lésions. Dans l'étude australienne, des souches avec le gène *netB* sont isolés d'oiseaux atteints d'EN (Keyburn et al., 2008). Cependant la toxine NetB n'est pas essentielle à l'EN. Jusqu'à 25% des souches sans le gène *netB* ont été isolés d'oiseaux atteints d'EN (Cooper et Songer, 2009; Keyburn et al., 2008; Martin et Smyth, 2008).

1.3.2. Facteurs prédisposants

Il existe d'autres facteurs prédisposants à la pathologie que ceux physiques liés à l'âge, le sexe, et la génétique du poulet.

La qualité de l'alimentation des oiseaux est primordiale lors des premiers jours suivant l'éclosion. La base de leur alimentation repose sur des céréales comme le blé, l'orge, le seigle, l'avoine ou le maïs. Les poulets nourris à base de blé, de seigle, d'avoine ou d'orge sont plus susceptibles à l'EN que les poulets nourris avec une diète à base de maïs (Annett et al., 2002). Des chercheurs ont découvert que des extraits de blé et d'orge préalablement digérés permettent une meilleure prolifération de *C. perfringens in vitro* que les extraits de maïs (Williams, 2005). Lors de la prédigestion, on peut supposer que certaines enzymes dégradent les polysaccharides en sucres plus faciles à intégrer au métabolisme bactérien et à celui de l'hôte, ce qui pourrait expliquer ce rendement supérieur de croissance. Pour appuyer ces observations, des études rapportent que l'addition d'enzymes à la diète influence positivement la digestion des nutriments. L'altération des voies métaboliques de la fermentation par l'apport d'enzyme peut être bénéfique pour l'oiseau selon la répartition finale des nutriments (Bedford, 2000; Bedford, 1996a). L'efficacité du système enzymatique du poulet et l'hydrolyse des polymères par ce système accroît la consistance du bol alimentaire, ce qui en facilite sa digestion (Bedford, 1996a). Une diète riche en fibres accroît les risques de développer l'EN (Wilson, 1999) mais elle est moins influente qu'un grand apport de blé seulement (Branton et al., 1997). Le seigle et

l'orge font partis des facteurs causant une hausse de l'humidité de la litière et prédisposent ainsi l'animal aux maladies infectieuses (Williams, 2005).

Les céréales contiennent une bonne quantité de polysaccharides non amidonnés qui augmente la viscosité de la matière intestinale. Ceci a pour effet d'augmenter le temps de passage du bol alimentaire (Williams, 2005). Cette condition provoque une diminution de la concentration d'oxygène présent dans l'intestin favorisant la prolifération du *Clostridium* et la production d'entérotoxines (Bedford, 1996b). Les poulets nourris avec une diète à base de blé ou avec une coccidiose sont plus susceptibles à l'EN (Williams, 2005). Des auteurs croient que les risques d'EN liée à une diète à base de blé sont reliés à la disponibilité des nutriments ou à d'autres mécanismes privilégiant la croissance des *C. perfringens* et non à la viscosité en elle-même. Ces propos sont appuyés par des études dont une ne révélant aucune différence dans la concentration de *C. perfringens* quand la viscosité du bol alimentaire est augmentée par des sucres non métabolisables par la bactérie (Williams, 2005). De plus, les polysaccharides non amidonnés augmentent plutôt l'activité hydrique du contenu intestinal par la rétention des fluides présents. Cette conjoncture influence fortement la croissance bactérienne (McDevitt et al., 2006). Certains polysaccharides non amidonnés comme la lectine contenu dans le blé, interagissent avec la surface du tube digestif endommageant ainsi les cellules épithéliales et permettent leur colonisation par *C. perfringens* (McDevitt et al., 2006). D'autres facteurs comme le type de grains et l'environnement de croissance de ceux-ci, la structure physique de la diète et l'âge de l'oiseau influencent la viscosité du bol alimentaire (Bedford, 1996b).

Une source de protéines animales favorise aussi la croissance de *C. perfringens*. Une forte concentration de protéines animales dans l'alimentation des poulets est souvent associée à la présence d'EN dans les élevages (Williams, 2005). Certains chercheurs ont démontré une corrélation positive entre les protéines provenant d'une farine de poisson et le nombre de *C. perfringens* colonisant le tube intestinal. Cette corrélation est cependant absente avec les protéines de soya (Williams, 2005). Le niveau élevé de glycine et de

méthionine dans les farines de poisson pourrait être la cause de cette augmentation de l'agent infectieux. Ces acides aminés sont reconnus pour stimuler la croissance de *C. perfringens in vitro* (Williams, 2005).

Une diète élevée en zinc favorise l'EN. Le blé, les farines animales et les farines de poisson ont des concentrations élevées en zinc. Tous prédisposent à l'EN. Une production *in vitro* de la toxine alpha est amplifiée par la présence de zinc et il protège aussi la structure de la toxine contre la destruction par la trypsine (Williams, 2005).

Une faible acidité gastrique est un facteur prédisposant à l'EN parce que la croissance *in vitro* de *C. perfringens* est inhibée par un milieu acide et la production de toxine est amplifiée à pH élevé (Williams, 2005). Une étude démontre qu'une alimentation principalement constituée de protéines animales neutralise le pH du proventricule et gésier ce qui favorise la prolifération intestinale de *C. perfringens* (Williams, 2005). L'alcalinisation du tube digestif a d'ailleurs déjà été utilisée pour l'induction expérimentale de l'EN (Bernier et al., 1977).

Des dommages causés à la muqueuse intestinale facilitent la prolifération de *C. perfringens* et la production de toxines (Williams, 2005). Les méfaits peuvent être causés de façon mécanique par la consommation de litière d'oiseaux ou par une diète comportant de la matière fibreuse (Annett et al., 2002) mais les probabilités d'induction de l'EN par ces voies sont plutôt faibles. Un gésier sain peut efficacement broyer de larges particules avant leur entrée dans le duodénum. En contrepartie, une étude montre une augmentation du taux de mortalité par l'EN chez des poulets nourris avec une diète dont les particules sont finement moulues comparativement à la même diète dont les particules sont plus grossières (Williams, 2005). Ceci nous révèle qu'il existe des facteurs plus déterminants à l'induction de l'EN chez l'oiseau sain qu'une alimentation dont la forme physique pourrait entraîner des dommages mécaniques à la paroi intestinale.

Les dommages de la muqueuse créés par une coccidiose favorisent aussi à l'EN (Pedersen et al., 2008; Williams, 2005). Des *Eimeria* ont été utilisés pour favoriser le développement d'EN dans certains modèles expérimentaux (Pedersen et al., 2008; Williams et al., 2003). Certains ont observé des lésions d'EN au jéjunum avec l'inoculation de souche d'*Eimeria maxima* avant l'inoculation de *C. perfringens* (Gholamiandehkordi et al., 2007). La destruction de la muqueuse par la coccidiose cause aussi une immunosuppression (McReynolds et al., 2004). Les cellules immunitaires détruites favorisent la prolifération de *C. perfringens*.

L'exposition à d'autres maladies affectant le système immunitaire telles la maladie de Marek et la maladie de Gumboro prédisposent l'oiseau à l'EN (McReynolds et al., 2004; Williams, 2005). Une fois le système immunitaire affecté, la production des immunoglobulines A sécrétoires sera inhibée. Ce dysfonctionnement au niveau de l'immunité permet la fixation des agents pathogènes à la muqueuse intestinale et la prolifération de ceux-ci. Un tel scénario est propice à l'induction de l'EN.

Peu d'informations sont disponibles sur le rôle du climat dans le développement de l'EN. En 1973, une augmentation de la prévalence de l'EN a été observée en fin d'été en Ontario (Long, 1973). Selon la littérature, il existe des variations de l'incidence de l'EN selon l'emplacement géographique des élevages (Williams, 2005). Des recherches plus approfondies sur l'interaction des facteurs climatiques comme l'humidité et la température en relation avec l'incidence de l'EN, permettraient d'éclaircir les connaissances sur ce sujet.

1.3.3. Intégration des modèles expérimentaux

Plusieurs modèles expérimentaux ont été mis au point afin de reproduire l'EN. Puisqu'il y a de multiples facteurs prédisposants, il n'existe pas de protocole standard pour la reproduction expérimentale de la maladie. Certes une compréhension plus approfondie

des interactions entre *C. perfringens* et les facteurs prédisposants à l'EN a permis l'amélioration des protocoles et la mise au point d'un modèle d'EN représentatif de cas de terrain.

En 1977, Bernier et al. (Bernier et al., 1977) se basent sur deux principes pour réaliser l'un des premiers modèles d'infection expérimentale d'EN de la littérature : l'alcalinisation du tube digestif par du carbonate de calcium et l'augmentation du temps de passage du contenu digestif par le ralentissement du péristaltisme sous l'action d'opiacés. Il évalue l'efficacité de son modèle à reproduire la maladie par l'examen histologique et macroscopique, la comparaison du taux de mortalité entre les groupes et l'isolement de *C. perfringens*. L'étude rapporte l'isolement de *C. perfringens* par culture anaérobie. Par la suite et durant plus d'une décennie, plusieurs modèles ont vu le jour afin de valider l'efficacité des antibiotiques promoteurs de croissance à contrôler la maladie. L'évaluation du score lésionnel a permis de quantifier les lésions intestinales et de réaliser des études statistiques appropriées. En 1999, par son modèle, l'équipe de Kaldhusdal et al. établit une corrélation positive entre le nombre de *C. perfringens* et la présence de lésions intestinales et les mortalités dues à l'EN (Kaldhusdal et al., 1999). En 2003, Williams et son équipe réalisent un modèle expérimental fort intéressant. Ces derniers donnent un prétraitement de coccidies de genre *Eimeria* à l'aide d'une surdose de vaccin anticoccidien constitué d'oocystes vivants quelques jours avant l'inoculation avec *C. perfringens* (Williams et al., 2003). Les dommages causés par les coccidies favorisent le développement de l'EN suite à l'inoculation de *C. perfringens*. Ce patron renforce l'existence d'une relation entre la coccidiose et l'EN en plus d'offrir une bonne base pour la conception d'un modèle expérimental correspondant à la réalité des cas d'EN de terrain. En 2004, McReynolds combine des agents pathogènes immunosuppresseurs à des diètes favorisant l'EN. Les oiseaux nourris d'une moulée à 55% de blé ont reçu en plus soit 10 fois la dose recommandée d'un vaccin contre la maladie de Gumboro ou 24 fois la dose recommandée d'un vaccin anticoccidien constitué d'oocystes vivants d'*Eimeria* ou les deux vaccins avant l'inoculation de 10^7 UFC de *C. perfringens* par ml (McReynolds et al., 2004). Des lésions

intestinales furent observées pour chaque traitement. Cependant aucune différence ne fût observée entre le score lésionnel obtenu par la vaccination des *Eimeria* combiné à l'inoculation de *C. perfringens* comparativement à l'inoculation des *C. perfringens* seulement. En 2006, Olkowski et son équipe réalisent un modèle avec l'inoculation d'une dose de 1 ml contenant 3×10^{10} UFC de *C. perfringens* provoquant peu de lésions intestinales comparativement au modèle où la dose quotidienne de 10^8 UFC de *C. perfringens* est challengée durant 7 jours (Olkowski et al., 2006).

Depuis 2007, des chercheurs conçoivent maintenant des modèles expérimentaux *in vivo* à l'aide d'*Eimeria* (Pedersen et al., 2008). Lors d'une étude portant sur l'immunopathologie et la réponse des cytokines lors d'une co-infection aux *Eimeria* et *C. perfringens*, les chercheurs ont ciblé pour leur modèle expérimental les *Eimeria maxima* comme facteur prédisposant (Park et al., 2008). La co-infection a induit des lésions macroscopiques au niveau du jéjunum.

Dans l'objectif de standardiser la reproduction expérimentale d'EN, une équipe belge (Gholamiandehkordi et al., 2007) a publié un système de quantification des lésions intestinales microscopiques, complémentaire à celui macroscopique, utilisé par Prescott (Prescott et al., 1978). Cet outil est utile afin de standardiser les protocoles pour développer et valider des modèles d'EN correspondants à la réalité de terrain. Cependant les précédents modèles ne correspondent pas aux cas d'EN typique observés sur le terrain.

1.4. Description de l'entérite nécrotique

1.4.1. Signes cliniques externes

Les signes cliniques externes associés à l'entérite nécrotique sont peu discriminants ce qui rend l'identification de la maladie ardue. Ils apparaissent généralement entre la 2^e et la 5^e semaine d'âge du poulet (Norton et Hoerr, 1999). L'abattement et la déshydratation des oiseaux, l'ébouriffement des plumes, la perte d'appétit et la diarrhée sont les signes

cliniques observés lors d'une épisode d'EN (Brennan et al., 2001; Van Immerseel et al., 2004). La diarrhée est identifiée comme étant le signe commun des cas cliniques légers pour les infections aux *C. perfringens*. Certains auteurs notent des changements physiques de la litière dus à l'augmentation d'humidité produite par la diarrhée des poulets infectés (Williams, 2005). L'association entre la litière plus humide et l'EN est prise en considération au Royaume-Uni, si bien qu'un taux élevé d'humidité est souvent reconnu comme précurseur de l'EN et permet d'initier le traitement. Même si la corrélation est significative, il existe cependant d'autres facteurs contribuant à l'augmentation de l'humidité dans la litière tel que la qualité de l'alimentation, une mauvaise ventilation, une température élevée, une intoxication aux mycotoxines ou aux parasites tels les *Eimeria* (Park et al., 2008; Pedersen et al., 2008; Williams, 2005).

1.4.2. Forme sous-clinique

Le problème majeur lié à l'EN est la mauvaise conversion alimentaire. Il en résulte une diminution du gain de poids et/ou une perte de poids chez les poulets de chair (Lovland et Kaldhusdal, 1999). L'intégrité intestinale est essentielle pour une conversion alimentaire optimale. La conversion alimentaire est définie comme la quantité d'aliment consommée par l'animal pour obtenir un kilogramme de masse. La dysbactériose ou le déséquilibre de l'équilibre de la microflore intestinale peut entraîner une mauvaise conversion alimentaire et conduire à la diarrhée dans certains cas (Wilson, 1999). Ce phénomène émerge d'un bris de l'équilibre microbien par des facteurs favorisant les bactéries pathogènes au détriment des souches commensales. La dominance des clostridies dans la microflore et les nécroses entériques occasionnées par ceux-ci sont des facteurs de risque mettant en danger l'intégrité intestinale qui implique directement une diminution du rendement et des pertes économiques.

1.4.3. Lésions macroscopiques et nécrose

Les changements majeurs observés lors de nécropsie de cas d'EN reposent sur la présence de lésions entériques nécrotiques et hémorragiques de la muqueuse (Brennan et al., 2001). Un agglomérat de tissus nécrotiques forme une pseudomembrane qui est caractéristique de la forme clinique de l'EN. Dans la forme classique d'EN, les lésions peuvent être réparties tout au long de l'intestin, du duodénum aux caeca (Van Immerseel et al., 2004). La pseudomembrane se compose de tissus intestinaux nécrosés et de débris cellulaires (Olkowski et al., 2006). La surface de la muqueuse est recouverte de cette pseudomembrane dont la couleur varie du gris brun au jaune brun. Les tissus nécrosés peuvent posséder une apparence diphtérique (Brennan et al., 2001). Cette apparence diphtérique est observée et caractéristique des cas cliniques de terrain mais n'est pas rapportée dans la littérature lors d'infection expérimentale (Bernier et al., 1977; McReynolds et al., 2004; Pedersen et al., 2008). Comme le mentionne Olkowski, l'apparence de la nécrose mucosale des intestins d'oiseaux dans les modèles expérimentaux peut s'avérer différente des cas cliniques (Olkowski et al., 2006). Pour les premières étapes, la muqueuse intestinale est sévèrement endommagée bien qu'il y ait des foyers où les lésions sont moins développées. Il est possible que le petit intestin devienne friable, finement tapissé d'une pseudomembrane, dilaté et rempli de gaz (Norton et Hoerr, 1999; Van Immerseel et al., 2004). L'équipe de Bernier observe des débris à l'extrémité des villosités et des cellules épithéliales du duodénum et du jéjunum devenant granulaires suite à l'inoculation seule de *C. perfringens* (Bernier et al., 1977).

L'EN peut entraîner une hépatite ou une cholangiohépatite (Mitsch et al., 2004). Le foie plus gros, devient ferme, verdâtre, pâle et il y a apparition de foyers de nécrose (Lovland et Kaldhusdal, 1999, 2001). Des *C. perfringens* provenant du tube digestif rejoignent le foie via la circulation sanguine et les canaux biliaires (Van Immerseel et al., 2004). La paroi de la vésicule biliaire est épaissie et il peut y avoir de l'ictère au sein du troupeau (Lovland et Kaldhusdal, 2001).

1.5. Stratégies prophylactiques contre l'entérite nécrotique aviaire

1.5.1. Contrôle des facteurs prédisposants

La maîtrise des facteurs prédisposants à l'EN est une excellente stratégie complémentaire aux traitements préventifs afin de contrôler la maladie. Les céréales et les farines d'origine animale favorisant la maladie doivent être réduites ou retirées de la diète des poulets (Williams, 2005) ou complémentées par des enzymes (Bedford et Apajalahti, 2000, 2001). De plus, les farines d'origine animale peuvent être une source de contamination par *C. perfringens* et de nutriments pour ce dernier. La combinaison d'enzymes tels que la bêta glucanase, la xylanase, la pectinase, et la cellulase accroissent la digestion des polysaccharides et diminuent les risques d'EN (Williams, 2005). Le contrôle des facteurs modifiant le taux d'humidité aide au maintien de la santé des oiseaux. Une épaisseur adéquate de litière, une bonne capacité d'absorption de celle-ci, le choix de la diète des volailles, un système de ventilation efficace qui assèche la litière sont des facteurs essentiels pour atteindre cet objectif de maintien de la santé intestinale. L'enlèvement de la litière entre les élevages et le changement régulier de celle-ci permet de contrôler les bactéries sporulantes comme *C. perfringens* (Williams, 2005).

1.5.2. Promoteurs de croissance antimicrobiens

La microflore intestinale fait ainsi partie d'un écosystème complexe qui intègre le développement intestinal, l'immunosurveillance et la compétition exclusive contre les microorganismes pathogènes. Toutefois, la microflore n'est parfois pas suffisante pour protéger à elle seule la muqueuse contre les agents pathogènes.

Depuis plus de 50 ans, l'industrie agricole utilise des promoteurs de croissance (Dibner et Richards, 2005). Ces antibiotiques administrés en continu dans l'alimentation

des troupeaux qui, via différents mécanismes d'actions, favorisent la croissance des animaux en l'absence de maladies infectieuses. La bacitracine (Prescott et al., 1978), la virginiamycine (Dumonceaux et al., 2006; Hofacre et al., 1998), la tylosine (Collier et al., 2003; Dibner et Richards, 2005) et les tétracyclines (Martel et al., 2004) sont des promoteurs de croissance antimicrobiens qui permettent de maîtriser le développement de l'EN dans les élevages de poulets.

L'apparition de résistance aux antibiotiques dans les populations microbiennes entraîne l'émergence de problèmes plus complexes. Ce phénomène permet non seulement au microorganisme acquéreur de résistance de survivre au traitement mais augmente aussi la niche écologique par celui-ci en détruisant la flore. La régression de la flore sensible accroît la disponibilité des nutriments pour les bactéries résistantes. L'augmentation de l'espace et des nutriments disponibles pour un agent pathogène acquéreur de résistance permet sa colonisation à l'intérieur de l'hôte et sa multiplication. Ceci exerce une pression sélective contre la flore commensale entraînant un débalancement des populations potentiellement néfaste pour l'oiseau. De plus, l'hôte devient un réservoir pour cette bactérie résistante et sert de vecteur pour la transmission de ce microbe dans le troupeau. Par contre l'utilisation de traitements faisant appel à d'autres mécanismes d'action ne permettant pas de développer une résistance serait encouragée.

1.5.3. Alternatives aux promoteurs de croissance antimicrobiens

Suite aux études sur l'émergence de bactéries multirésistantes, plusieurs gouvernements européens ont pris l'initiative de réduire ou même interdire l'utilisation des promoteurs de croissance (Dibner et Richards, 2005). Conséquemment, les antibiotiques curatifs sont de plus en plus utilisés afin de traiter les oiseaux présentant des signes cliniques d'EN. Certains pays tel le Canada permettent à l'industrie avicole d'utiliser les ionophores comme anticoccidiens. Les ionophores réduisent la présence de lésions de

coccidiose intestinale, atténuant ainsi les risques de colonisation du tube digestif par *C. perfringens* ce qui décroît les probabilités d'entraîner l'EN (Williams, 2005).

Afin d'éviter l'antibiorésistance, l'industrie avicole étudie de nouvelles stratégies et alternatives prophylactiques pour prévenir l'EN. Premièrement, un contrôle de l'environnement des élevages par un programme de reconnaissance de salubrité à la ferme améliore le statut sanitaire du troupeau et peut prévenir le développement de certaines maladies au sein de l'élevage. Le programme s'inspire du code de bonnes pratiques de production et basé sur l'analyse du risque (ACIA, 2005).

De concert avec les programmes de salubrité, l'industrie avicole encourage le développement de nouveaux traitements prophylactiques contre l'EN pour parer à l'antibiorésistance. Suite à l'interdiction d'utiliser des promoteurs de croissance dans l'alimentation des troupeaux, les producteurs européens utilisent de nouveaux additifs alimentaires pour contrôler l'EN. Certaines huiles essentielles (HE) (Friedman et al., 2002; Lee et al., 2004; Mitsch et al., 2004) et acides organiques (AO) (Eklund, 1983) sont présentement à la disposition des producteurs comme alternatives possibles pour prévenir l'EN.

Les acides organiques, utilisés en élevage porcin (Biagi et al., 2006; Partanen et Mroz, 1999; Piva et al., 2002) sont considérés comme une alternative aux promoteurs de croissance pouvant être applicables en productions avicoles. En résumé, le mode d'action des AO sur les bactéries est l'entrée des acides non dissociés dans celles-ci provoquant un stress sur l'homéostasie intracellulaire des bactéries sensibles aux variations extrêmes de pH. Dans un environnement à faible pH, lorsque les acides organiques traversent la membrane bactérienne sous cette forme, ils pénètrent dans le cytoplasme plus alcalin et se dissocient. La dissociation résulte en un relâchement de particules chargées incapable de traverser la membrane plasmique. Les AO non dissociés pénètrent celle-ci jusqu'à ce que l'équilibre entre les pH interne et externe soit atteint résultant en une accumulation de charges ioniques dans le cytoplasme (Brul et Coote, 1999). Le relâchement des charges

ioniques des acides, favorisé par le pH intracellulaire peut entraîner des dommages irréversibles aux cellules bactériennes. Ceci peut résulter de la lyse de la membrane, de l'inhibition du métabolisme et de l'accumulation des anions toxiques dans les cellules bactériennes (Presser et al., 1997). La littérature reconnaît que ces AO sous forme non dissociée peuvent avoir une activité antimicrobienne significative selon les caractéristiques du microorganisme ciblé (Eklund, 1983; Presser et al., 1997). La constitution des bactéries à Gram positif, exemptes de membrane externe diminue la résistance intrinsèque de la cellule à la pénétration des AO.

Les huiles essentielles de plante sont une source potentielle de substances antimicrobiennes. Ces dernières ont des vertus préventives contre les infections (Si et al., 2006). Contrairement aux acides organiques, on peut retrouver un bon nombre de recherches sur des traitements prophylactiques à base d'HE utilisées par les producteurs avicoles. Ces huiles sont définies comme un mélange de substances hydrophobes volatiles obtenues à partir de plantes possédant des caractéristiques propres. L'activité antimicrobienne de ces molécules est principalement due à leur caractère hydrophobe permettant l'insertion des composés aromatiques dans les membranes lipidiques. L'intégration des molécules perturbe la configuration lipidique et protéique de la structure membranaire. L'impact majeur est la variation des gradients de diffusion et métabolismes associée à l'augmentation de la fluidité membranaire (Sikkema et al., 1995). La concentration des constituants de ces huiles varie selon les conditions de croissance des plantes. Pour standardiser la production des traitements, les fabricants reproduisent des formulations synthétiques des ingrédients actifs antimicrobiens. Des composantes actives d'huiles essentielles sont reconnues pour leur activité antimicrobienne, comme l'eugénol, le thymol, le cinnamaldehyde, la β -ionone et le carvacrol (Gill et Holley, 2006a, b; Lee et al., 2004; Si et al., 2006). L'activité antimicrobienne des HE est dirigée contre un large spectre de microorganismes dont *C. perfringens*. Les huiles provenant du *Thymus vulgaris* ou celles de l'*Origanum vulgare* ont une activité inhibitrice contre *C. perfringens* (Mitsch et al., 2004). Certains mélanges déjà distribués sur le marché pour les volailles sont constitués

d'huiles essentielles d'origan et de thym. Grâce à cette activité antimicrobienne contre *C. perfringens* de certaines huiles essentielles, celles-ci ont le potentiel d'être utilisées à titre d'alternatives aux promoteurs de croissance pour contrôler l'EN.

Chapitre 2. Évaluation *in vitro* des traitements alternatifs contre l'entérite nécrotique

2.1. Résumé

L'effet bactéricide *in vitro* a été déterminé par la méthode des concentrations minimales inhibitrices. Des microorganismes indicateurs ont été utilisés en présence de traitements alternatifs potentiels pour prévenir l'entérite nécrotique. La croissance des microorganismes en présence d'huiles essentielles et/ou d'acides organiques a été comparée à leur croissance en présence de bacitracine de zinc, un antibiotique utilisé comme promoteur de croissance en élevage chez les poulets en prévention de l'EN. Le pouvoir inhibiteur et le spectre d'action des 3 traitements ont été étudiés. L'altération de la croissance a été observée chez *C. perfringens*, une bactérie à Gram positif et l'agent infectieux responsable de l'EN puis chez *E. coli*, un microorganisme indicateur, bactérie à Gram négatif et présent dans la flore commensale du poulet.

2.2. Introduction

L'utilisation des promoteurs de croissance administrés en continu dans les élevages de poulets de chair permet la prévention d'EN. Cependant cette pratique est associée au phénomène d'antibiorésistance. Des alternatives aux promoteurs de croissance sont développées pour contrer l'antibiorésistance et maintenir les performances des élevages. Les huiles essentielles qui modifient la perméabilité membranaire des bactéries par un débalancement ionique et les acides organiques qui entrent dans le cytoplasme bactérien et y brisent l'homéostasie pourraient se révéler d'excellentes alternatives aux promoteurs de croissance. Cependant peu d'informations sont disponibles sur l'efficacité de ces alternatives, n'étant pas régies par les mêmes réglementations que les promoteurs de croissance antimicrobiens. L'objectif est d'évaluer l'efficacité *in vitro* des huiles essentielles et des acides organiques comme alternatives aux promoteurs de croissance. Les critères d'évaluation étudiés sont le pouvoir inhibiteur et le spectre d'action des traitements.

2.3. Méthodologie

2.3.1. Traitements

Les huiles essentielles OléobiotecTM volaille (Oléobiotec) sont constituées d'huiles essentielles de thym, d'origan et d'écorce de cannellier. Les acides organiques GalliacidTM (Jefo) sont constitués d'acide fumarique, de propionate de calcium, de formiate de calcium puis de sorbate de potassium. La bacitracine de zinc est distribuée par la compagnie Fluka (Fluka, United States).

2.3.2. Concentration minimale inhibitrice en microplaque

L'évaluation des CMI des 3 traitements a été effectuée en microplaque 96 puits sous atmosphère anaérobie. Le protocole a été inspiré de l'article de Watkins (Watkins et al., 1997). Pour chaque traitement, une série de dilutions du produit dans un milieu *Brain Heart Infusion* a été incorporée en duplicata sur deux microplaques différentes à 200 µl par puits. Le spectre des concentrations à utiliser pour chacun des trois conditionnements a été déterminé préalablement par des études pilotes. Des *C. perfringens* provenant de cas cliniques ou des *E. coli* ATCC 25922 à une concentration de 10⁵ UFC/ml ont été inoculés dans chaque puits sauf pour les blancs (puits témoin sans bactérie) et les contrôles négatifs (puits témoin sans antibiotique). Les microplaques ont été scellées sous atmosphère anaérobie, incubées à 37°C et des lectures à 630 nm à chaque heure durant 8 heures ont été effectuées. Les densités optiques ont été enregistrées par un lecteur multiple (BioTek Instruments inc.). Des pourcentages de croissance ont été établis pour chacune des bactéries en présence d'une concentration donnée du traitement. Le pourcentage de croissance représente le rapport sur cent entre la moyenne des densités optiques observées et la croissance optimum, où la bactérie n'est pas en présence du traitement.

2.4. Résultats

Les plus grands écarts de croissance entre les différentes concentrations des divers traitements ont été observés après 8 heures pour *C. perfringens* et *E. coli* (Figure 1). À cette période, un effet inhibiteur a été noté sur la croissance des *C. perfringens* avec des concentrations supérieures à 250 PPM pour OléobiotecTM volaille, des concentrations supérieures à 2500 PPM pour GalliacidTM et supérieures à 31 PPM pour la bacitracine de zinc. À ce même temps, un effet inhibiteur a aussi été noté sur la croissance des *E. coli* avec des concentrations supérieures à 250 PPM pour OléobiotecTM volaille et des concentrations supérieures à 2500 PPM pour GalliacidTM. Cependant aucun effet inhibiteur n'a été observé pour la bacitracine de zinc avec *E. coli*. Malgré l'observation d'effet inhibiteur pour les deux bactéries aux mêmes concentrations avec chacun des traitements, des spectres d'action différents ont été observés (Figure 2 et 3). Des pourcentages de croissance distincts ont été relevés pour *C. perfringens* ($20\% \pm 12\%$) et *E. coli* ($65\% \pm 10\%$) en présence de 2500 PPM de GalliacidTM.

Figure 1 : Pourcentage de croissance en présence de différentes concentrations d'Oléobiotec™ volaille pour *C. perfringens* (gris uni) et *E. coli* (noir rayé) à 8h.

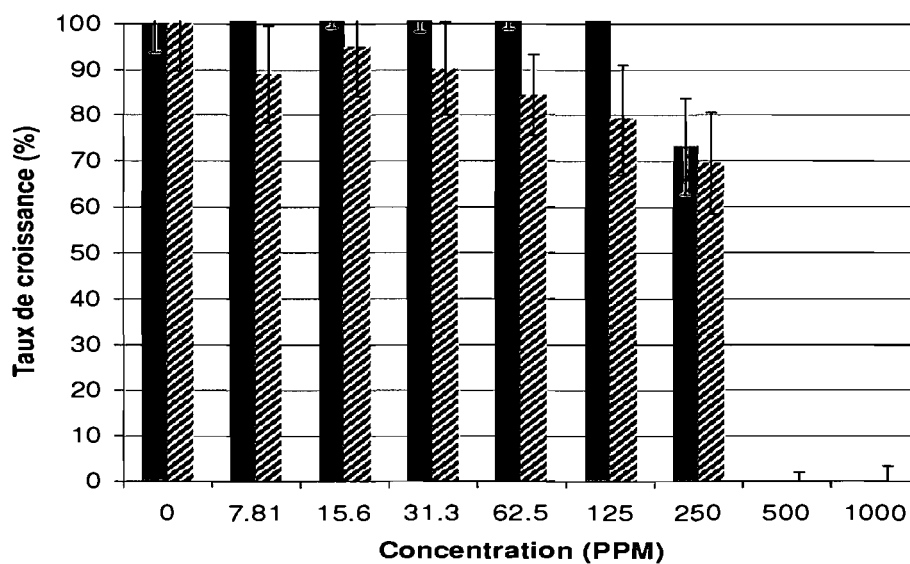
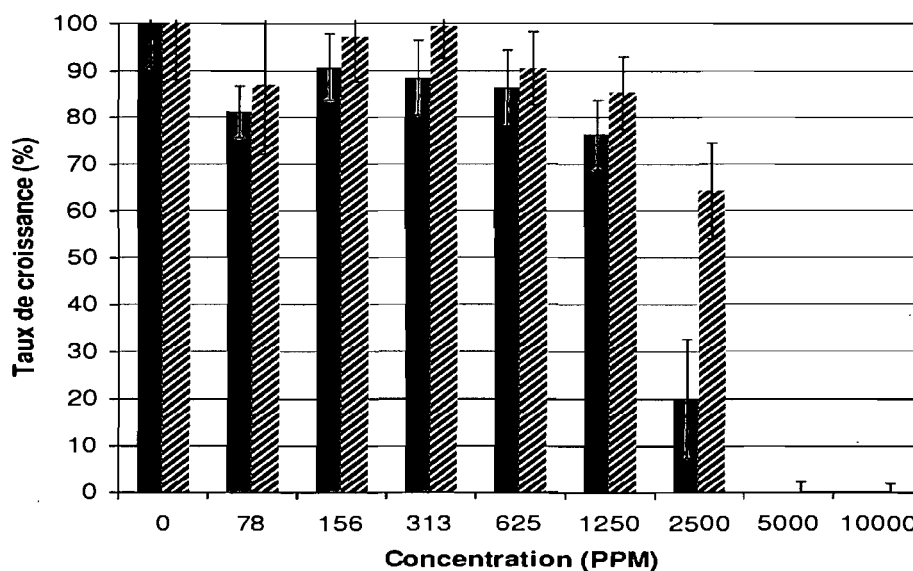


Figure 2 : Pourcentage de croissance en présence de différentes concentrations de Galliacid™ pour *C. perfringens* (gris uni) et *E. coli* (noir rayé) à 8h.



2.5. Discussion

Un pouvoir inhibiteur contre *C. perfringens* a été déterminé pour le OléobiotecTM volaille et le GalliacidTM, traitements alternatifs aux promoteurs de croissance antimicrobiens. Selon le traitement, des spectres d'action différents ont été constatés. Il aurait été intéressant de suivre l'action inhibitrice au-delà des 8 heures d'évaluation afin de vérifier si elle se poursuit ou même s'amplifie. Selon les résultats obtenus, une administration en continu de ces molécules via l'aliment serait préférable afin d'optimiser le potentiel inhibiteur de ces traitements.

Les divergences de spectres d'action ainsi que les concentrations minimales inhibitrices permettent de montrer un effet inhibiteur sur les bactéries ciblées. Cependant les résultats *in vitro* ne présume en rien l'efficacité *in vivo* des alternatives, dû à la complexité de l'écosystème intestinal du poulet.

Il sera donc intéressant de vérifier l'efficacité de ces produits face à un challenge d'entérite nécrotique *in vivo*. Voilà pourquoi la prochaine étape consistera à développer et valider un protocole d'infection expérimentale de cette maladie.

**Chapitre 3. Article: Assessment of *Eimeria* and Wheat
Feed to Induce Experimental Necrotic Enteritis and their
Impact on the Intestinal Microflora of Broiler Chickens**

In preparation, 2008

Eimeria and Wheat Feed to Induce Experimental Necrotic Enteritis and their Impact on the
Intestinal flora of Broiler

**Assessment of *Eimeria* and Wheat Feed to Induce
Experimental Necrotic Enteritis and their Impact on the
Intestinal Microflora of Broiler Chickens**

Mathieu Bélanger,^A Philippe Fravalo,^C Ann Letellier,^B Robert Gauthier,^D Alexandre
Thibodeau,^B Jean-Michel Repérant,^C Martine Boulianne,^E

^AFaculté de Médecine Vétérinaire, Département de Sciences Cliniques, Université de
Montréal, 3190 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

^BFaculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pathologie et Microbiologie, Université
de Montréal, 3190 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

^CAgence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 41 Beaucemaine, BP 53, 22440
Ploufragan, France

^DJEFO Nutrition Inc., 5020 Avenue Jefe, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7B6

^ECorresponding author. Faculté Médecine Vétérinaire, Département des Sciences
Cliniques, Université de Montréal, 1500 des Vétérinaires, Saint-Hyacinthe, Québec,
Canada J2S 6N9 E-mail: [REDACTED]

Key words: Broilers, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, infection model, *Eimeria*, wheat, intestinal microflora

Abbreviations: AMB = aerobic mesophilic bacteria; CE SSCP = capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism; TC = thermoresistant coliforms; CFU = colony forming unit; Cp = *Clostridium perfringens*; DNA = deoxyribonucleic acid; dNTP = deoxyribonucleotide triphosphate; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; LB = lactobacilli; NE = necrotic enteritis; PCR = polymerisation chain reaction; PFGE = pulsed-field gel electrophoresis; Tris = trishydroxymethylaminomethane;

SUMMARY. A *Clostridium perfringens* infection was carried out to assess both *Eimeria* infection and a high wheat content feed as predisposing factors to induce necrotic enteritis in broiler chickens. Chickens were divided in 5 groups: three groups were fed with a continuously administered diet made respectively of 45%, 35% or 25% wheat and 2 groups, fed with a 35% wheat feed content, received either 40 or 24 times the recommended dose of a live *Eimeria* vaccine 5 days prior to the clostridial challenge. Chickens were inoculated *per os* with 3 toxin-producing *Clostridium perfringens* isolates obtained from clinical cases. After challenge, clinical signs were recorded and a macroscopic lesion score was carried out. Only groups previously inoculated with *Eimeria* vaccine showed clinical signs and macroscopic lesions in the jejunum, representative of necrotic enteritis field cases. Jejunal and cecal contents were collected for thermoresistant coliforms, lactobacilli, *Clostridium perfringens* and aerobic mesophilic bacteria counts. Two days post-inoculation, the group with the 24 times vaccine dose showed higher *Clostridium perfringens* counts in the jejunum than the controls. Bacterial count variations were shown in the caeca for selected bacterial groups. *Clostridium perfringens*, lactobacilli and aerobic mesophilic bacteria counts in group fed with 45% wheat feed were higher than its control. Aerobic mesophilic bacteria counts were higher in groups with the 24 and 40 times vaccine dose versus their control. Lactobacilli were higher in group with 40 times vaccine dose versus its control. A high live *Eimeria* vaccine dose coupled with a high wheat feed content was able to induce experimental necrotic enteritis in broiler chickens after *Clostridium perfringens* challenge. Intestinal microflora variations could be associated. This model will be used in the future to assess the antimicrobial alternatives efficacy to prevent necrotic enteritis, and provides a tool to understand the intestinal microflora changes occurring before or during the illness.

INTRODUCTION

The rise of the antibiotic resistance phenomenon and the consumers concern for the use of antimicrobials in food animals has led the European Community to ban numerous growth promoters in poultry. These progressive withdrawals were first initiated in 1997 (Directive 97/6/CE), but were soon followed by an increase in the incidence of necrotic enteritis (NE) in broiler chickens (14, 24). Although the situation in North America is different because antimicrobials are still being added to poultry feed, there is a current trend to produce antibiotic-free chickens. However the major deterrent to the growth of this still niche market remains the fear of a NE outbreak occurring in a flock.

Some non-antimicrobial feed additives appear to regulate the enteric microflora to the benefit of the chicken broiler health hence preventing the development of NE (11). The efficacy of these alternatives needs to be assessed in controlled conditions with an experimental model representative of clinical signs of *C. perfringens* infection. Models have been reported but few reproduce clinical signs and mortality as they occurred in NE field cases (3, 10, 15-17, 26). Briefly for each model, Bernier et al. reported visible necrotic lesions and mortality following the administration of opium, but today's legal context make it difficult to use opiates. Other researchers (10, 15-17, 26) observed grossly visible focal necrotic lesions in mucosa of jejunum without inducing mortality.

Substantial evidence supports the role of alpha toxin, a phospholipase C that hydrolyses cell membrane phospholipids (8, 21) as a major virulence factor (1, 9). A recent report has questioned the importance of alpha toxin and suggests that the NetB toxin plays the major key role in the pathogenesis of NE yet (13). The facts that conducted to the paradigm shift in understanding of the pathogenesis of NE were recently reviewed (25). The origin of *C. perfringens* isolates is determinant to induce NE. Outbreaks isolates are more able to induce NE in experimental broilers chickens models (20). A high wheat feed content was shown to increase the tackiness of the intestinal contents, prolong transit time

and stimulate *C. perfringens* growth (4, 5). Coccidiosis is also known to damage the intestinal epithelium and is expected to facilitate *C. perfringens* growth leading to the development of NE (26, 27).

A *C. perfringens* challenge, associated with a high live *Eimeria* vaccine dose and/or a high wheat feed content as predisposing factors, was carried out to establish an experimental model for necrotic enteritis similar to the disease observed in clinical cases. Indicator bacteria counts in different intestinal segments were also obtained to initiate the understanding of microflora changes associated with NE.

MATERIALS AND METHODS

Birds and housing. A total of 360 day-old Ross broiler chickens were obtained from a commercial local hatchery and housed in the confined facilities of the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments on Ploufragan site and housed in cages, 75 birds per cage, for the remaining of the trial. The *Eimeria* vaccinated chickens were moved to the avian parasitology facility at 7 days of age in a 3 birds per cage settings.

Experimental study design. Upon arrival, birds were divided into three groups depending on the wheat content (45, 35 and 25%) of their all vegetable feed. The same feed treatment per group was administered *ad libitum* throughout the trial. At 7 days of age, the 35% wheat feed group was further subdivided to include another treatment i.e., the administration of 24 or 40 times the recommended dose of a live *Eimeria* vaccine. A total of five treatment groups of 72 birds each were obtained and named as follow: A, B and C received a 45, 35 and 25% wheat feed content respectively, while the groups D and E, fed with a 35% wheat diet were additionally vaccinated with 24 and 40 times the recommended dose of an anticoccidial vaccine respectively, at 9 days of age. Group B was considered the negative control for the *Eimeria* effect. Chickens were challenged with *C. perfringens* at 14 days of age, except for twelve birds per group, our negative controls that were not inoculated but maintained in the same cages in direct contact with inoculated birds. For the

3 birds per cage setting, our negative controls were maintained with 2 inoculated birds. During the challenge, chickens were inoculated 5 consecutive times with the same *C. perfringens* mixed dose, every twelve hours, over a three days period.

Coccidial inoculum. Groups D and E received 24 and 40 times respectively, the manufacturer's recommended dose of Coccivac BTM *per os*. Coccivac BTM is an anticoccidial vaccine containing live oocysts of *Eimeria acervulina*, *E. mivati*, *E. maxima*, and *E. tenella* (Coccivac BTM, Schering-Plough, Kenilworth, NJ).

Clostridial inoculum. A mix of 3 *C. perfringens* strains: 2003-1256, 2006-4758 and SHY07 383, each isolated from NE clinical cases was used. The strains were previously confirmed with API 20A tests (BioMérieux, France). *C. perfringens* strains 2003-1256, 2006-4758 and SHY07 383 were analysed for alpha toxin production with the *AmplexRed Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Assay* (Molecular probes, USA) in our laboratories, and *C. perfringens* strains 2003-1256, 2006-4758 and SHY07 383 were characterized for the presence of toxin NetB gene (13) at the CSIRO laboratory (Geelong, Vic, Australia). All strains were maintained frozen at -80°C in a *Brucella* broth until the start of the trial: they were then cultured at 37°C during 24h in anaerobic jars with the use of the Mitsubishi AnaeroPak® system (OXOID, United Kingdom) in brain heart infusion broth. The broth was streaked on tryptic soy agar with 5% sheep blood and further incubated at 37°C during 18h in anaerobic jars. Each strain cultures were suspended in tryptone salt broth to reach a DO_{600nm} of 0.6, corresponding to 8 Log CFU/mL, mixed together to constitute the inoculum suspension that was given *per os* (1.0 mL/ bird).

Birds health monitoring. Clinical signs and mortality were recorded every 2 days before challenge and daily starting on the day of the first *C. perfringens* inoculation. The necrotic enteritis clinical signs criteria were base on some combination of depression, huddling, ruffled feather and changes in fecal consistency (6). Macroscopic lesion scoring of the intestinal mucosa was performed on the day of *C. perfringens* inoculation, 12 hours after the first inoculate and on day 2 and 9 post-inoculation according to Prescott (18).

Briefly, 6 birds (5 inoculated and 1 not inoculated) of each group were euthanatized and a post mortem examination was performed. Lesions were graded from 0 to 4, with 0 for no lesion, 1 for a friable small intestine, 2 for focal necrosis and ulceration, 3 for large necrosis patches and 4 for diffuse necrosis typical of field cases.

Histopathology. A segment of the jejunum adjacent to the Meckel's diverticulum was sampled on the day of *C. perfringens* inoculation and on day 2 and 9 post inoculation. Three samples from inoculated and 1 from non-inoculated birds from each group were fixed in phosphate-buffered formalin, then embedded into paraffin. Five μm sections were cut and stained with hematoxylin and eosin. A scoring system similar to that of Gholamiandehkordi et al., (10) was used to assess microscopic lesions, with the addition of three other parameters i.e., presence of rod-shaped bacteria and necrotic material into the lumen and observation of inflammatory cells in the lamina propria, all on a 1 to 4 scale. The total score of the microscopic intestinal lesion was then calculated for each bird.

Bacteriology. Jejunum and caecum contents were sampled on the day of *C. perfringens* inoculation and on day 2 post-inoculation. For each group, 5 pools of 3 individual samples from inoculated and 1 from not inoculated birds were done. Fresh dropping samples were taken at 7 and 9 days of age, at 14 days of age prior to the first inoculation and on day 2 post-inoculation to assess environmental contamination.

Bacterial counts. All media, otherwise specified, were purchased from AES Laboratory (Bruz, France). The pooled material was homogenized and serially diluted in trypton salt broth before bacterial counts were done on 4 groups: *C. perfringens* counts were obtained on tryptose sulphite cycloserine agar, incubated at 37°C, 24h in anaerobic atmosphere. In case of doubt, characteristic colonies were confirmed on blood agar by double haemolysis zone and by reverse CAMP test (7). Five colonies were confirmed on selected samples. Thermoresistant coliforms were counted after spiral plating on violet red bile lactose agar and incubation at 44°C, 24h in aerobic atmosphere. Lactobacills counts were obtained after spiral plating and double layer in De Man, Rogosa and Sarpe agar (pH

5.6) incubated at 37°C, 72h in aerobic atmosphere. Aerobic mesophilic bacteria counts were done by spiral plating on tryptic soy agar, incubated at 30 °C, 24h in aerobic atmosphere.

CE SSCP Analysis. In case of great differences in bacterial counts further analyses were conducted on Clostridia populations using PCR and CE SSCP to describe the qualitative evolution of digestive flora when comparing control birds to challenged ones, group B and D respectively. Four pools of three individual jejunal contents were analysed before and after challenge of the birds with the *Clostridium* inoculum. For DNA extraction, 200 µg of intestinal content were diluted and vortexed in 1.4 ml of lysis buffer according to the manufacturer instructions (QIAamp® DNA stool mini-kit). For Nested PCR for Clostridia group analysis, first DNA amplification was done from 1 µl of extract DNA solution, added to the PCR mixture containing 1.3 µl of dNTP (10mM), 5µl of buffer 10X, 1.3 µl of each primer (100 ng/µl), 0.5 U Accuprime Taq DNA polymerase (2.5 U/µl), Milli-Q water was added to make a final volume of 50 µl. Both primers W18f: GAGTTTGATCMTGGCTCAG W109r: CCCTTTACACCCAGTAA (23) (Sigma-Proligo, UK) were used. The PCR conditions were as follows: denaturation for 2 min at 94°C and then 25 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 45°C, and 90 s at 68°C. No final elongation was performed, as recommended by the supplier (Invitrogen, California, USA). The reaction was stopped by cooling mixture to 4°C. Amplification product sizes were confirmed by electrophoresis. PCR products were diluted 100-fold, and 1 µl was used as a template for a PCR-CE SSCP analysis carried out using the primers and conditions described above. The PCR mix contained 0.5 U of pfu turbo DNA polymerase (2.5 U/µl). Both primers w49 (AGGTCCAGACTCCTACGGG) and w104* (*TTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Sigma-Proligo, UK) were used. Primer w104* was labelled with 5'-6 Fam fluorescent dye. Primer w49 was labelled with Hex fluorescent dye. Milli-Q water was added to obtain a final volume of 50 µl. The mixture was run for 2 min at 94°C, then 25 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 61°C, 30 sec at 72°C, and 10 min at 72°C. PCR reactions were performed with a Gene Amp 9700 or 2400 (Applied Biosystems, France). After amplification, 10 µl of the

amplified product were run on a horizontal 2% agarose gel in Tris–borate–EDTA 1X, with a DNA ladder of 100 bp size (Ozyme, France). Gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) during 20 min. For the CE SSCP electrophoresis, according to the intensity signal observed on the agarose gel, DNA was diluted 2 to 100 fold in water. 1 µl of the standardised amount of PCR product was mixed with 18.5 µl of sequencing buffer mix and 0.5 µl of internal standard HD 400 [rox] (Applied Biosystems, Foster City, USA). After a denaturing step at 95°C during 5 min, the mix was quickly cooled on ice during 10 min before capillary electrophoresis conducted in a Genetic Analyser 3100-Avent (Applied Biosystems, France). The CE SSCP gel composition was 6.22 g of CAP polymer (Applied Biosystem, Foster City, USA), 1 g of glycerol (In Vitrogen, France), 1 ml of 10X buffer (Applied Biosystem, Foster City, USA), completed to 10 ml with Milli-Q water. All capillary electrophoresis were run in at 32°C under 15kV. CE SSCP profiles were obtained using GeneMapper software (Applied Biosystem, Foster City, USA) and compared by BioNumerics® (Applied Maths). Similarities between profiles, based on peak presence and positions, were established using Bionumerics software based on the use of the Jaccard's coefficient determination. A dendrogram was constructed to reflect the similarities between the profiles in the matrix. Profiles were clustered by the Unweighted Pair-Group Method using the Arithmetic Mean.

PFGE Analysis. PFGE was used to compare *Clostridium* isolates issued from different conditions of this trial. Isolates were grown overnight on blood agar plates, at 37°C under anaerobic conditions. A homogenous suspension of bacteria was embedded in 1.0% SeaKem Gold Agarose (Lonza, Switzerland) thick plugs to obtain a final OD_{600nm} of <1.25. Plugs were incubated in solution of 6 mM Tris, 100 mM EDTA, 1M NaCl, 0.5% Brij58, 0.2% sodium deoxycolate and 0.5% lauroyl sarcosine with 10 mg/mL lysozyme (Sigma-aldrich, Missouri, USA) with gentle shaking at 37°C for 4 h. They were then rinsed for 15 min in Tris-EDTA buffer and subsequently incubated overnight in EDTA 0.25 M, 20 mM NaCl, 1% lauryol sarcosine with 2 mg/mL proteinase K (Qiagen, Ontario, Canada), pH 8.0 at 54°C with shaking at 140 rotations per minute. They were then rinsed three times

each for 1 hour in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 to remove traces of proteinase K. A 1 hour under 80V tension step of pre-electrophoresis was done on one plug per isolate. Then, the plug was incubated at 30°C for 24h in 300 µL fresh digestion buffer containing 60 U of the restriction enzyme *SmaI* (Invitrogen, California, USA) following the manufacturer's recommendations. Electrophoresis was performed in a 1.5% SeaKem Gold Agarose gel with Tris-EDTA buffer. Gels were run in 0.5× Tris–borate–EDTA containing 200 µM Thio-urea (Sigma-aldrich, Missouri, USA) at 14 °C for 20 h. Pulse times started at 4 s and ended at 38 s, with linear ramping and a field of 200V and an angle of 120° in a Gene Navigator unit (Amersham Biosciences).

Statistical analysis. Bird mortality between each group was analysed using the non-parametric comparison of the proportion of dead birds in each group (chi-square of Pearson). Group depending lesion scoring between groups was established using the Cochran-Mantel-Haenszel test (SAS, Cary, USA). Mean bacterial counts were compared with a Kruskal Wallis test with a significant level of 5% (NCSS, Utah, USA).

RESULTS

Toxin characterization. For the alpha toxin production *in vitro*, strains 2003-1256, 2006-4758 and SHY07 383 produced 2.83 ± 0.86 , 3.02 ± 0.69 and 2.65 ± 0.32 units (U) per ml in broth solution respectively after 18h incubation (Table 1). One unit is defined as the amount of enzyme that will liberate 1.0 µmole of water soluble organic phosphorus from L- α -phosphatidylcholine per minute at pH 7.3 at 37°C. *C. perfringens* strains 2003-1256, 2006-4758 and SHY07 383 were characterized for the presence of toxin NetB gene at the CSIRO laboratory (Geelong, Vic, Australia). The results showed that strains 2003-1256 and 2006-4758 had the NetB gene. Strain SHY07 383 does not carry the NetB gene.

Clinical assesement. For ethical reasons the infection protocol was terminated after the 4th inoculation for groups D and E. Diarrhea was observed as early as 12 hours after the first inoculation in group D. Chickens from groups D and E exhibited depression,

diarrhoea, swollen crop and blood stained droppings on day 1 and 2 post-inoculation, with an increase in severity over time. A 13% and 19% of mortality was observed in group D and E respectively on day 2 post-inoculation. Overall, only these two groups were affected with mortalities. Three days post-inoculation, clinical signs disappeared but few birds remained affected with diarrhea until day six post-inoculation.

Macroscopic lesion scoring. Only birds from groups D and E showed typical lesions of necrotic enteritis mostly located at the distal end of the duodenum or in the jejunum (Fig. 1). Lesion scoring was significantly higher ($p < 0.001$) in groups D and E (mean score 0.83 and 2.5 respectively) than in the other groups (mean score 0).

Histopathology. The highest microscopic intestinal lesion scores were observed on day 2 post-inoculation in all groups (Table 2), with groups D and E being the most affected. Inflammatory cells, mostly heterophils were observed in the *lamina propria* in large number on day 9 post-inoculation only.

Bacteriology. For jejunal contents on the second day post-inoculation, lactobacilli, lactose-positive thermoresistant coliforms, *C. perfringens* and aerobic mesophilic mean counts in groups A and B were not different from their control group C for high wheat feed content effect (Table 3). Results obtained for lactobacilli, lactose-positive thermoresistant coliforms and aerobic mesophilic mean counts in groups D and E were not different from their control group B for *Eimeria* effect (Table 4). *C. perfringens* mean counts were different and higher ($Z > 1.96$) for group D (3.00 Log CFU/g) than its control group B (0.95 log CFU/g) (Table 4). There was no statistical difference between group E (1.33 Log CFU/g) and its control group B (0.95 log CFU/g) for *C. perfringens* mean counts.

For the caecum, still on the second day post-inoculation, *C. perfringens*, lactobacilli and aerobic mesophilic bacteria mean counts were significantly higher ($Z > 1.96$) in group A than its control group C when looking at the high wheat content effect (Table 5). Aerobic mesophilic bacteria mean counts were higher ($Z > 1.96$) for group D and E compared to their control group B for *Eimeria* effect (Table 5). Lactobacilli mean counts were higher

($Z > 1.96$) for group E than its control group B for *Eimeria* effect (Table 6). Others population mean counts did not statistically differ from their control groups.

CE SSCP Analysis. Analysis of the dendrograms describe the evolution of the organization of the clostridia populations before and after *Clostridium* inoculation. Before inoculation with experimental *C. perfringens* (3 different isolates from EN field associated samples) the clostridia populations in the jejunum contents of birds issued from group D and B at the start of the challenge were not differentiated (Fig. 2). The dendrogram describe an heterogeneity and clostridia profiles from group D and its control group B are not clearly differentiated. On the second day post-inoculation, *Clostridium* populations were reorganized with a clear clustering of samples issued from D appearing (Fig. 3). This group was different from the control group samples.

PFGE Analysis. Genotypic characterization of *C. perfringens* inoculum strains i.e. 2003-1256, 2006-4758, SHY07 383, was performed by PFGE. Their genetic profiles were compared to the patterns of isolates from environment before *C. perfringens* inoculation and isolates from all groups at second day post-inoculation (Table 7.). *SmaI* restriction enzyme yielded different PFGE profiles for 2003-1256, 2006-4758 and SHY07 383 strains, (Fig. 4) revealing a high discriminatory power among inoculated strains. Identical PFGE profiles were found when comparing *Clostridium perfringens* inoculated strains to the *C. perfringens* isolates from birds second day post-inoculation which demonstrates that the inoculated strains became predominant in the clostridia indigenous population. Interestingly *Clostridium perfringens* strains isolated from birds in direct contact with birds from groups D and E (i. e. not challenged orally with *C. perfringens*) harboured a restriction profile identical to the 2003-1256 strain profile (profile 1). The SHY07 383 profile (profile 3) was found in inoculated birds isolates, in contact birds isolates and in environment isolates on second day post-inoculation. A single different PFGE profile was found twice when analysing *C. perfringens* from environment (fresh droppings) before the *C. perfringens* challenge occurred (profile 4).

DISCUSSION

A *Clostridium perfringens* infection, associated with a high live *Eimeria* vaccine dose and/or a high wheat feed content as predisposing factors, was carried out to establish an experimental model for necrotic enteritis similar to the disease observed in clinical cases. Another objective was to better understand microflora changes associated with NE occurring in the different intestinal segments.

A mix of 3 *C. perfringens* strains: 2003-1256, 2006-4758 and SHY07 383, each isolated from different NE clinical case was made to inoculate the chickens to optimize the model. Their association was intended to increase the probability of effectively recreating the disease. Only isolates from NE clinical cases were chosen because it seems that the origin of *C. perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers chickens (20).

Our experimental model successfully reproduced clinical signs, macroscopic lesions and mortality compatible with necrotic enteritis. Indeed, four inoculates were enough to reproduce necrotic enteritis in groups D and E fed with 35% wheat content diet and pre-challenged with 24 and 40 times the recommended dose of *Eimeria* vaccine.

Overall, most groups behaved similarly on the day of inoculation. Microscopic jejunal lesions typical of field necrotic enteritis were observed on day 2 post-inoculation in groups D and E. Other groups showed some degree of lesions but not the widespread epithelial necrosis we observed in groups D and E. Because of our experimental model, we have not included presence of coccidia in the score. This would have skewed our overall results since only two groups were challenged with an *Eimeria* vaccine overdose. We however felt that presence of rod-shaped bacteria and necrotic material in the intestinal lumen were important to include as well as the presence of inflammatory cells in the *lamina propria*, all of which were missing from Gholamiandehkordi et al.'s microscopic score. Contrary to this author, we could not measure villi height and crypt depth due to the

disappearance of villi architecture on the second day post-inoculation in many birds of groups D and E. Because of these observations, it was surprising to see how well *C. perfringens* birds recovered from their challenge when looking at the intestinal mucosa on day 9 post-inoculation.

Until recently, few authors have considered using *Eimeria* oocysts in their experimental model as a potential predisposing factor to induce the NE. (10, 15-17, 26). Park and al. (16) inoculated *Eimeria maxima* strain from a commercial broiler source and observed grossly visible focal necrotic lesions in the jejunum. Following attenuated live vaccine (ParacoxTM) and field strain (*E. maxima* administration) Gholamiandehkordi and al. (10), and Pedersen and al. (17) observed grossly visible focal necrotic lesions in the jejunum, but without the expected mortality. Interestingly, to alleviate the severity of the clinical signs, both authors administered the oocysts simultaneously to the clostridial challenge. According to our results and previous experience, an *Eimeria* challenge should be planned 4 to 6 days prior to the clostridial inoculation in order for the oocysts to create sufficient mucosal damage hence optimizing *C. perfringens* invasion. Otherwise, when the resulting NE is subclinical with mild lesions and no mortality, quantitative histopathology must be used to differentiate groups as described by Gholamiandehkordi (10). The use of a commercial live vaccine made of a known and well defined oocysts population is also ideal for reproducibility reasons and ease of use. McReynolds and al. (15) have used 24 times the recommended dose of a commercial live *Eimeria* vaccine combine with a 55% wheat feed diet. They observed no differences in mean lesion score between this combination of predisposing factors and *C. perfringens* inoculation only.

The diet played a key role for the induction of necrotic enteritis in broilers. Our experimental model used in part a high wheat feed content for predisposing broilers to NE. Wheat diet contribute to increased clostridial proliferation (2). It has been shown that a high wheat feed content increases the tackiness of the intestinal contents and prolongs transit time stimulating *C. perfringens* growth and contributing to NE development (4, 19) Some

authors used fishmeal diet obviously to increase clostridial proliferation and induced NE. Nevertheless, high fishmeal content in diet formulation have biogenic amines like histamine which can produce parallel mortality (22).

Pedersen (17) detected several *C. perfringens* in the jejunal region 1 day after *Eimeria* infection with mean counts are high as 7.29 and 7.07 log CFU/g for the challenged *C. perfringens* and *Eimeria* groups in both Pedersen experiments. For our experiment, high jejunal *C. perfringens* counts were also observed 2 days after first inoculation. Macroscopic lesions typical of NE were observed and correlate with higher *C. perfringens* mean counts in group D (3.00 log CFU/g) than its control group B (0.95 log CFU/g). A similar trend although non significant was also observed with higher *C. perfringens* counts for group E (1.33 log CFU/g) than its control group B (0.95 log CFU/g). To qualitatively assess the evolution of clostridia population in jejunum of these birds exposed or not to *Eimeria* before the *Clostridium perfringens* inoculation, a CE SSCP analysis was performed. Transitional variations of *C. perfringens* intestinal microflora appeared during the clostridial challenge and were corroborated by CE SSCP and bacterial counts. This tool have been previously used for monitoring complex microbial community (12).

PFGE was conducted to validate the colonisation of the birds after inoculation with our experimental strains. As well as verify which strain was horizontally transmitted to the non-inoculated chickens. Different PFGE profiles were observed between inoculated isolates revealing high discriminatory power with *SmaI* among inoculated isolates. PFGE profile of inoculated isolate 2006-4758 was not found in clostridial inoculated birds on the second day post-inoculation. Although we collected few samples, perhaps another virulence factor such as the bacterial growth affected intestinal colonisation capacity by isolate 2006-4758. PFGE profiles of inoculated isolates 2003-1256 and SHY07 383 were found in clostridial inoculated birds on the second day post-inoculation. Whereas, similar PFGE profiles were also found from no *C. perfringens* challenged bird. PFGE profiles of these birds were not similar to the profiles of isolates PF13c and PF14d from environment,

sampled before the *C. perfringens* challenge. This suggests that among few isolated strains in this trial, the clostridial indigenous population before challenge seems to be free of the inoculated isolates before the challenge. This imply that a horizontal transmission between no *C. perfringens* challenged birds and the inoculated ones occurred. Interestingly, PFGE profiles of isolates PF13c and PF14d were not found from birds and environment on the second day post-inoculation. This suggests that the inoculated isolates became predominant in the clostridial indigenous population. From groups showing typical lesions of field necrotic enteritis, despite the fact that PFGE profile of inoculated isolates SHY07 383 was found in the environment, only profile of 2003-1256 was found in birds on the second day post-inoculation. Finally, both toxins were identified for strain 2003-1256, suggesting their implication in the disease.

Our experimental model successfully reproduced clinical signs, macroscopic lesions and mortality compatible with necrotic enteritis. Our experimental model included two predisposing factors to induce NE, a high wheat feed content combined to a co-infection of *Eimeria* from an anticoccidial vaccine. The inoculation of the coccidial vaccine overdose was done five days before the clostridial challenge to optimize the gut damages by the *Eimeria*. The association of three specific *C. perfringens* strains which were characterized for two toxins as major virulence factors, isolated from different NE clinical case was intended to increase the probability of effectively recreating the disease.

This model will be used to assess alternatives strategies to the administration of antibiotics in the diet in preventing from developing NE and could be used to better understand the role of changes in digestive flora.

REFERENCES

1. Al-Sheikhly, F., and R. B. Truscott. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. Avian Dis 21:241-255. 1977.
2. Annett, C. B., J. R. Viste, M. Chirino-Trejo, H. L. Classen, D. M. Middleton, and E. Simko. Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. Avian Pathol 31:598-601. 2002.
3. Bernier, G., J. B. Phaneuf, and R. Fillion. Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Study of the factors favoring the multiplication of *Clostridium perfringens* and the experimental transmission of the disease. Can J Comp Med 41:112-116. 1977.
4. Branton, S. L., F. N. Reece, and W. M. Hagler, Jr. Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. Poult Sci 66:1326-1330. 1987.
5. Branton, S. L., B. D. Lott, J. W. Deaton, W. R. Maslin, F. W. Austin, L. M. Pote, R. W. Keirs, M. A. Latour, and E. J. Day. The effect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in broiler chickens. Poult Sci 76:24-28. 1997.
6. Brennan, J., G. Moore, S. E. Poe, A. Zimmermann, G. Vessie, D. A. Barnum, and J. Wilson. Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens. Poult Sci 80:1451-1454. 2001.
7. Buchanan, A. G. Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of *Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol 16:761-762. 1982.

8. Flores-Diaz, M., M. Thelestam, G. C. Clark, R. W. Titball, and A. Alape-Giron. Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe* 10:115-123. 2004.
9. Fukata, T., Y. Hadate, E. Baba, T. Uemura, and A. Arakawa. Influence of *Clostridium perfringens* and its toxin in germ-free chickens. *Res Vet Sci* 44:68-70. 1988.
10. Gholamiandehkordi, A. R., L. Timbermont, A. Lanckriet, W. Van Den Broeck, K. Pedersen, J. Dewulf, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol* 36:375-382. 2007.
11. Hofacre, C. L., T. Beacorn, S. Collett, and G. Mathis. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *J Appl Poultry Res* 12:60-64. 2003.
12. Hong, H., A. Pruden, and K. F. Reardon. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods* 69:52-64. 2007.
13. Keyburn, A. L., J. D. Boyce, P. Vaz, T. L. Bannam, M. E. Ford, D. Parker, A. Di Rubbo, J. I. Rood, and R. J. Moore. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* 4:e26. 2008.
14. Lovland, A., and M. Kaldhusdal. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24:345-351. 1999.
15. McReynolds, J. L., J. A. Byrd, R. C. Anderson, R. W. Moore, T. S. Edrington, K. J. Genovese, T. L. Poole, L. F. Kubena, and D. J. Nisbet. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poult Sci* 83:1948-1952. 2004.

16. Park, S. S., H. S. Lillehoj, P. C. Allen, D. W. Park, S. FitzCoy, D. A. Bautista, and E. P. Lillehoj. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis* 52:14-22. 2008.
17. Pedersen, K., L. Bjerrum, O. E. Heuer, D. M. Wong, and B. Nauerby. Reproducible infection model for *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Dis* 52:34-39. 2008.
18. Prescott, J. F., R. Sivendra, and D. A. Barnum. The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. *Can Vet J* 19:181-183. 1978.
19. Riddell, C., and X. M. Kong. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis* 36:499-503. 1992.
20. Timbermont, L., A. Lanckriet, A. R. Gholamiandehkordi, F. Pasmans, A. Martel, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008.
21. Titball, R. W., C. E. Naylor, and A. K. Basak. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* 5:51-64. 1999.
22. Tucker, J. F., E. G. Harry, and A. P. Laursen-Jones. The role of histamine and fish meal in the incidence of gizzard erosion and pro-ventricular abnormalities in the fowl. *Br Poult Sci* 16:69-78. 1975.
23. Van Dyke, M. I., and A. J. McCarthy. Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Appl Environ Microbiol* 68:2049-2053. 2002.

24. Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol* 33:537-549. 2004.
25. Van Immerseel, F., J. I. Rood, R. J. Moore, and R. W. Titball. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol.* 2008.
26. Williams, R. B., R. N. Marshall, R. M. La Ragione, and J. Catchpole. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol Res* 90:19-26. 2003.
27. Williams, R. B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol* 34:159-180. 2005.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the CORPAQ and the Chair in Poultry Research from the Université de Montréal for funding the project, the Chair in meat safety team of the Université de Montréal for technical support, Unité Hygiène et Qualité des produits avicoles et porcins and Unité Virologie Immunologie Parasitologie Avicole et Cunicole team from Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments of Ploufragan, with special thanks to Maryline Queguiner and Françoise Lalande for their technical assistance during the trial.

TABLES

Table 1. Evaluation of *C. perfringens* (mix inoculum) strains alpha toxin production *in vitro*

Strain	Dilution	U/ml ^A
2003-1256	1/80	2.83 ± 0.86
2006-4758	1/80	3.02 ± 0.69
SHY 07 383	1/160	2.65 ± 0.32

^AOne unit is defined as the amount of enzyme that will liberate 1.0 µmole of water soluble organic phosphorus from L-α-phosphatidylcholine per minute at pH 7.3 at 37°C.

Table 2. Mean total score of microscopic intestinal lesions on inoculation day (Day I) after *C. perfringens* inoculation, day 2 (Day 2 PI) and 9 (Day 9 PI) post *C. perfringens* inoculation for various groups.

Group	Eimeria	Wheat	Day I	Day 2 PI	Day 9 PI
A	0	45%	0 ^A	1.66 ^{AD}	2.66 ^D
B	0	35%	0.66 ^A	3.75 ^D	4.3 ^{CD}
C	0	25%	2 ^A	6 ^C	7 ^C
D	24x	35%	2 ^A	13.33 ^B	4 ^{CD}
E	40x	35%	3 ^A	14 ^B	6.3 ^C

Values with different superscripts are statistically significantly different (p<0.05).

Table 3. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of *C. perfringens* (Cp), lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from jejunum contents, second day post *C. perfringens* inoculation when assessing wheat content effect.

Group	Eimeria	wheat	Cp	LB	TC	AMB
A	0	45%	0.95	7.64	5.68	7.79
B	0	35%	0.95	7.38	6.52	7.43
C	0	25%	0.95	7.50	5.84	7.56

*Significant term versus control group

Table 4. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of *C. perfringens* (Cp), lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from jejunum contents, second day post *C. perfringens* inoculation when assessing *Eimeria* effect.

Group	Eimeria	wheat	Cp	LB	TC	AMB
D	24x	35%	3.00*	7.27	6.30	8.02
E	40x	35%	1.33	7.29	6.29	7.60
B	0	35%	0.95	7.50	5.84	7.56

*Significant term versus control group

Table 5. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of *C. perfringens* (Cp), lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from cecal contents, second day post *C. perfringens* inoculation when assessing wheat content effect.

Group	Eimeria	wheat	Cp	LB	TC	AMB
A	0	45%	5.81*	8.85*	8.58	8.68*
B	0	35%	5.28	8.38	7.87	8.06
C	0	25%	3.48	8.02	8.39	8.42

*Significant term versus control group

Table 6. Bacteriological mean counts (in Log CFU/g) of *C. perfringens* (Cp), lactobacilli (LB), thermoresistant coliforms (TC) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) from cecal contents, second day post *C. perfringens* inoculation when assessing *Eimeria* effect.

Group	Eimeria	wheat	Cp	LB	TC	AMB
D	24x	35%	6.82	8.64	8.20	8.84*
E	40x	35%	4.45	8.89*	7.56	8.69*
B	0	35%	5.28	8.38	7.87	8.06

*Significant term versus control group

Table 7. Pulse field gel electrophoresis of *C. perfringens* strains isolated during the trial.

Identification	Origin	Group	Date	Profile
2003-1256	inoculum			1
2006-4758	inoculum			2
SHY07 383	inoculum			3
PF 127	challenged bird	A	2 PI ^B	3
PF 112	contact bird	A	2 PI ^B	3
PF 105a	environment (droppings)	A	2 PI ^B	3
PF 105f	environment (droppings)	A	2 PI ^B	3
PF 190	challenged bird	B	2 PI ^B	3
PF 14d	environment (droppings)	B	1 ^A	4
PF 181	challenged bird	C	2 PI ^B	3
PF 13c	environment (droppings)	C	1 ^A	4
PF 132	challenged bird	D	2 PI ^B	1
PF 128a	contact bird	D	2 PI ^B	1
PF 128b	contact bird	D	2 PI ^B	1
PF 129a	contact bird	D	2 PI ^B	1
PF 129b	contact bird	D	2 PI ^B	1
PF 106c	environment (droppings)	D	2 PI ^B	3
PF 160	challenged bird	E	2 PI ^B	1
PF 163	challenged bird	E	2 PI ^B	1
PF 148	contact bird	E	2 PI ^B	1

^A1, day of inoculation before *C. perfringens* challenge started^B2 PI, Two days post *C. perfringens* inoculation

ILLUSTRATIONS



Fig. 1. Necrosis on chicken jejunum mucosa at second day post inoculation from groups receiving both the coccidial vaccine and *Clostridium perfringens* inoculums.

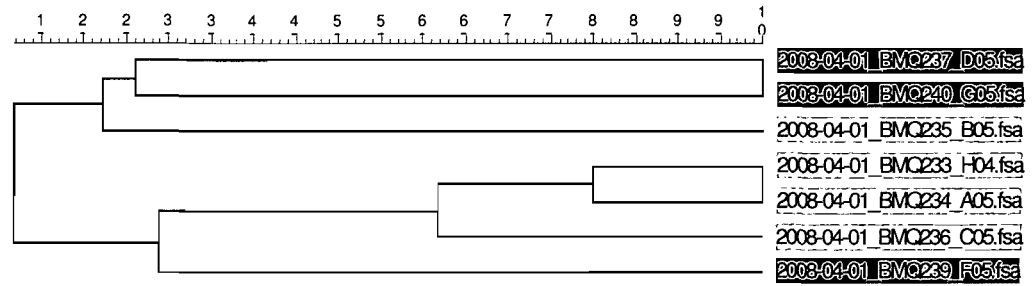


Fig. 2. Dendrogram by CE SSCP of pool of fecal material samples from group D (yellow) and its control group B (green) at day of *C. perfringens* inoculation.

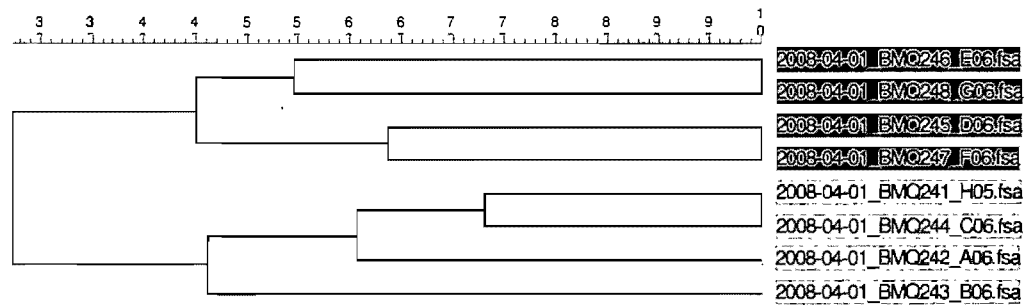


Fig. 3. Dendrogram by CE SSCP of pool of fecal material samples from group D (yellow) and its control group B (green) second day after starting *C. perfringens* inoculation

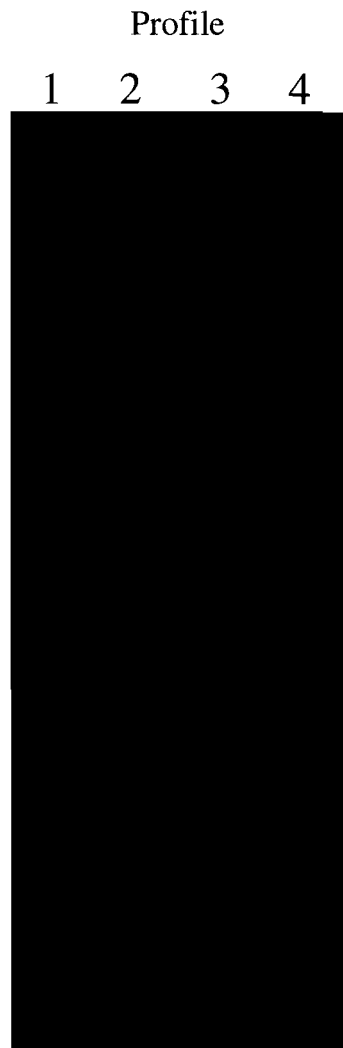


Fig. 4. PFGE of *C. perfringens* isolates 2003-1256 (profile 1), 2006-4758 (profile 2), SHY07 383 (profile 3) and isolate PF14d sampled from environment at the day of inoculation before *C. perfringens* challenge started (profile 4).

Discussion

L'utilisation des promoteurs de croissance administrés en continue dans les élevages de poulets de chair permet la prévention d'EN. Cependant cette pratique est associée au phénomène d'antibiorésistance. Des alternatives aux promoteurs de croissance sont développées pour contrer l'antibiorésistance et maintenir les performances des élevages. Un pouvoir inhibiteur contre *C. perfringens* a été déterminé pour les huiles essentielles OléobiotecTM volaille et les acides organiques GalliacidTM, traitements alternatifs aux promoteurs de croissance antimicrobiens. Selon le traitement, des spectres d'action différents ont été constatés. Il aurait été intéressant de suivre l'action inhibitrice au-delà des 8 heures d'évaluation afin de vérifier si elle se poursuit ou même s'amplifie. Ici, l'évaluation du temps de contact entre le traitement alternatif et les bactéries justifierait l'importance d'une administration continue des alternatives aux poulets. Les divergences de spectres d'action ainsi que les concentrations minimales inhibitrices permettent de montrer un effet inhibiteur sur les bactéries ciblées. Cependant les résultats *in vitro* ne présume en rien l'efficacité *in vivo* des alternatives, dû à la complexité de l'écosystème intestinal du poulet.

Une infection par divers isolats de *Clostridium perfringens*, combinée à une concentration élevée d'*Eimeria* vivants provenant d'un vaccin et/ou une alimentation à haute teneur en blé comme facteur prédisposant, sont utilisés pour établir un modèle expérimental d'entérite nécrotique similaire aux cas cliniques observés sur le terrain. Un autre objectif était de mieux comprendre les changements de la microflore inhérent à l'apparition d'EN dans les différents segments intestinaux.

Notre modèle expérimental est l'un des seuls modèles reconnu capable de reproduire avec succès les signes cliniques, lésions macroscopiques et mortalité caractéristiques de l'entérite nécrotique. Dû au grand nombre de mortalités observées dans les groupes D et E à la fin de la période de challenge, il a été décidé pour des raisons éthiques de ne pas inoculer les oiseaux avec la dernière dose de *C. perfringens*. En fait,

quatre inoculations ont suffi pour reproduire l'entérite nécrotique dans le groupe nourri avec une alimentation constituée de 35% de blé et pré inoculé avec 24 fois la dose recommandée d'un vaccin d'*Eimeria*.

Un cocktail de 3 isolats de *C. perfringens*: 2003-1256, 2006-4758 et SHY07 383, chacun isolé de différent cas clinique d'EN, a été conçu pour inoculer les poulets. Seulement des isolats provenant de cas cliniques ont été sélectionnés car l'origine du *C. perfringens* semble déterminer son habileté à induire l'EN chez le poulet de chair (Timbermont et al., 2008). Leur association a été faite dans le but d'accroître la probabilité de reproduire le plus réellement possible la maladie. La virulence des isolats est aussi associée à la production de toxines. Les isolats 2003-1256, 2006-4758 et SHY07 383 ont été analysés pour la production de la toxine alpha et la présence de gène pour la toxine NetB. Ces deux toxines représentent les facteurs de virulence majeurs de *C. perfringens* associés à l'EN chez le poulet.

Jusqu'à aujourd'hui, quelques auteurs ont inclus les oocystes d'*Eimeria* dans leur modèle expérimental comme facteur prédisposant pour induire l'EN (Gholamiandehkordi et al., 2007; McReynolds et al., 2004; Park et al., 2008; Pedersen et al., 2008; Williams et al., 2003). Suite à l'incorporation d'un vaccin vivant atténué (ParacoxTM) et d'isolat de terrain d'*E. maxima*, les équipes de Gholamiandehkordi, Park et Pedersen ont observé des lésions focales nécrosantes très visibles sur la muqueuse du jéjunum des poulets. Les équipes de Gholamiandehkordi et Pedersen ont cependant conçu des modèles sans mortalité chez les poulets. De façon intéressante, pour réduire la sévérité des signes cliniques, les deux auteurs ont administré les oocystes durant le challenge avec *C. perfringens*. Selon nos résultats et les expérimentations antérieures, l'inoculation d'*Eimeria* devrait être planifiée entre 4 à 6 jours avant le challenge des clostridies pour permettre aux oocystes de créer des dommages suffisants à la muqueuse et optimiser les dommages des *C. perfringens*. Autrement, lorsque l'EN résultante est subclinique avec des lésions moindres et aucune mortalité, l'histopathologie quantitative doit être utilisée pour différencier les

groupes tel que décrit par Gholamiandehkordi. L'utilisation d'un vaccin vivant commercialisé constitué d'une population d'oocystes connue et bien définie est idéale pour des raisons de reproductibilité et de facilité d'utilisation. L'équipe de McReynolds (McReynolds et al., 2004) a réalisé un modèle utilisant 24 fois la dose recommandée d'un vaccin commercial d'*Eimeria* combiné à une diète constituée à 55% de blé. Cependant, ils n'ont pas observé de différence entre la moyenne des scores lésionnels de ce modèle et l'inoculation de *C. perfringens* seulement. Nos résultats démontrent une différence entre les scores lésionnels de nos modèles combinant une surdose d'un vaccin commercial d'*Eimeria* et une diète constituée à 35% de blé contre des modèles constitués uniquement d'une diète élevée en blé.

La diète joue un rôle clé pour l'induction de l'entérite nécrotique chez le poulet de chair. Notre modèle utilise en partie une alimentation à haute teneur en blé pour prédisposer les poulets à l'EN. La diète de blé contribue à la prolifération des *C. perfringens* (Annett et al., 2002). Il est démontré qu'une diète à haute teneur en blé accroît la consistance du contenu intestinal et prolonge le temps de passage, les deux stimulant la croissance des *C. perfringens* et le développement de l'EN (Branton et al., 1987; Riddell et Kong, 1992). Certains auteurs utilisent des farines de poissons pour augmenter la prolifération des clostridies et induire l'EN. Cependant, on observe des mortalités non liées à l'EN mais plutôt occasionnées par des amines biogènes. De plus, une haute teneur en farine de poisson dans la formulation de la diète des modèles donne des odeurs déplaisantes dans les poulaillers et des saveurs de poissons qui réduisent l'acceptation de l'alimentation par les oiseaux.

Pedersen et al. ont détecté plusieurs *C. perfringens* dans la région jéjunale un jour après le début de l'infection d'*Eimeria* (Pedersen et al., 2008). Les comptes moyens sont aussi élevés que 7,29 et 7,07 log UFC/g pour les groupes challengés avec *C. perfringens* et *Eimeria*. Dans le jéjunum des oiseaux de notre étude, 2 jours après la première inoculation, des lésions macroscopiques typique d'EN sont observées dans la région jéjunale. Ceci est

en corrélation avec les comptes élevés de *C. perfringens* observés pour cette région. La moyenne des *C. perfringens* pour le groupe D (3,00 log UFC/g) nourri avec une diète contenant 35% de blé et pré-challengé avec 24 fois la dose recommandée d'un vaccin vivant d' *Eimeria* est plus élevée que pour le groupe E (0,95 log UFC/g), son contrôle pour l'effet *Eimeria*. Afin d'évaluer qualitativement l'évolution des populations de *C. perfringens* dans le jéjunum de ces oiseaux exposés ou non aux *Eimeria* avant les inoculations de *C. perfringens*, des analyses de CE SSCP ont été réalisées. Comme Hong et al., cette technique est utilisée pour faire un suivi des populations d'une microflore dans le temps. Des variations transitoires de *C. perfringens* dans la microflore intestinale apparaissant durant le challenge des clostridies sont observées par CE SSCP et corroborées par les comptes bactériens.

Le PFGE a été réalisé pour valider la colonisation des oiseaux après l'inoculation avec les isolats expérimentaux. Ceci permet de vérifier la transmission des isolats des oiseaux challengés vers les oiseaux non inoculés. Des profils de PFGE différents entre les isolats inoculés révèlent que l'enzyme de restriction *Sma*I a un haut pouvoir discriminant entre les isolats. Le profil PFGE de l'isolat inoculé 2006-4758 n'a pas été retrouvé parmi la population de clostridies chez les oiseaux inoculés au deuxième jour post-inoculation. Bien que le faible nombre d'isolats obtenu n'est pas représentatif de la population de clostridies présente, la vitesse de croissance de l'isolat 2006-4758 pourrait avoir influencé sur sa capacité de coloniser l'intestin des oiseaux. Les profils PFGE des isolats de *Clostridium* inoculés 2003-1256 et SHY07 383 ont été retrouvés au deuxième jour post-inoculation chez les oiseaux inoculés. Des isolats avec des profils PFGE similaires ont aussi été retrouvés chez les oiseaux non inoculés de *C. perfringens*. Les profils PFGE d'isolats retrouvés chez ces oiseaux diffèrent du profil des isolats PF13c et PF14d provenant de l'environnement avant le challenge des *C. perfringens*. Malgré le faible nombre d'isolats avant le challenge, ceci suggère que la population microbienne indigène des oiseaux avant le challenge n'était pas composée des isolats inoculés. Cela implique qu'une transmission horizontale s'est produite entre les oiseaux non challengés par *C. perfringens* et ceux inoculés. De plus, les

isolats PF13c et PF14d n'ont pas été retrouvés ni chez les oiseaux, ni dans l'environnement au deuxième jour post-inoculation. Ceci suggère que les isolats inoculés sont devenus prédominant dans la population indigène. Des groupes démontrant des lésions typiques d'EN de cas de terrain, seul le profil de l'isolat 2003-1256 a été retrouvé chez ces oiseaux au deuxième jour post-inoculation. Les deux toxines, alpha et NetB ont été identifiées chez l'isolat 2003-1256, suggérant son implication dans la maladie.

Nous ne pouvons pas distinguer les 2 groupes pour l'effet *Eimeria* sur la base de leur performance à induire l'entérite nécrotique. Ils diffèrent seulement au niveau de la mortalité. De plus, les comptes de *C. perfringens* pour le groupe 24x coccivacB a une différence statistiquement significative d'avec le contrôle mais on observe quand même des comptes élevés entre le groupe 40x coccivacB et son contrôle.

Nous devrions attribuer en parti, le succès du modèle expérimental à la combinaison de l'effet d'une co-infection d'*Eimeria* et une alimentation à haute teneur en blé prédisposant à l'EN et non aux dosages des *Eimeria* inoculés. La maladie est aussi influencée par la virulence/le pouvoir pathogène des isolats de *C. perfringens*. Les facteurs de virulence comme le niveau de production des toxines et son origine jouent pour beaucoup sur l'induction de l'EN.

Conclusion

La recrudescence de l'EN à l'échelle internationale et particulièrement dans l'Union Européenne est principalement due au retrait des promoteurs de croissance antimicrobiens de l'alimentation des poulets de chair. Entraînant des pertes économiques importantes pour l'industrie, des efforts de recherche sont déployés mondialement pour le développement d'alternatives aux promoteurs de croissance efficaces et abordables à incorporer dans les diètes des poulets. Toutefois, aucune mesure alternative ne s'est révélée aussi efficace que les antimicrobiens à prévenir le développement de *C. perfringens*. Les stratégies actuelles pour le contrôle de l'EN en l'absence de promoteurs de croissance antimicrobiens et ce sans l'utilisation de traitement prophylactique ou encore thérapeutique, sont surtout axées sur les diètes spécifiques comprenant des acides organiques et/ou des huiles essentielles et les pratiques d'élevage.

Notre meilleur modèle utilise deux facteurs prédisposants préalables à l'inoculation de *C. perfringens* en série. Dans le modèle proposé, les poulets sont challengés 5 fois à 12h d'intervalle au 14^e jour d'âge d'une forte concentration de *C. perfringens* avec une inoculation d'*Eimeria* au 9^e jour combinée à une diète à haute teneur en blé administrée depuis 1 jour d'âge au préalable. Les signes cliniques et lésions obtenues permettent à notre modèle de se distinguer des modèles récents présentés dans la littérature ne produisant pas la pathogénie typique de cas de terrain.

Les résultats de CE SSCP et PFGE suggèrent que le modèle peut avoir un impact sur la microflore commensale et influencer le développement de la maladie. D'autres recherches seraient appropriées pour obtenir plus d'informations au sujet de l'impact du modèle sur les variations des populations de *C. perfringens* durant le challenge.

À l'aube d'une nouvelle ère où les antimicrobiens et anticoccidiens pourront éventuellement être exclus des pratiques d'élevage de l'industrie avicole, la disponibilité d'un modèle d'infection expérimentale reproductible d'EN conforme à la réalité de terrain permettra de mieux évaluer l'efficacité et de définir les conditions d'applications optimum des stratégies et alternatives à prévenir l'EN.

Bibliographie

- Abercrombie, J.G., Paynter, M.J.B., Hayasaka, S.S., 2006. Ability of colicin V to control *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J Food Saf* 26, 103-114.
- ACIA 2005. Le programme de reconnaissance de la salubrité des aliments de la ferme (PRSAF)
- Al-Sheikhly, F., Truscott, R.B., 1977. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis* 21, 241-255.
- Amit-Romach, E., Sklan, D., Uni, Z., 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult Sci* 83, 1093-1098.
- Annett, C.B., Viste, J.R., Chirino-Trejo, M., Classen, H.L., Middleton, D.M., Simko, E., 2002. Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathol* 31, 598-601.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H., 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *Worlds Poult Sci J* 60, 223-232.
- Apajalahti, J.H., Kettunen, A., Bedford, M.R., Holben, W.E., 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 67, 5656-5667.
- Baba, S., Kukita, Y., Higasa, K., Tahira, T., Hayashi, K., 2003. Single-stranded conformational polymorphism analysis using automated capillary array electrophoresis apparatuses. *Biotechniques* 34, 746-750.
- Barbara, A.J., Trinh, H.T., Glock, R.D., Glenn Songer, J., 2008. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol* 126, 377-382.
- Barnes, E.M., 1979. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. Address of the president of the Society for Applied Bacteriology

- delivered at a meeting of the society on 10 January 1979. *J Appl Bacteriol* 46, 407-419.
- Barnes, E.M., Impey, C.S., 1972. Some properties of the nonsporing anaerobes from poultry caeca. *J Appl Bacteriol* 35, 241-251.
- Barnes, E.M., Mead, G.C., Barnum, D.A., Harry, E.G., 1972. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br Poult Sci* 13, 311-326.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W., 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 147, 173-180.
- Bedford, M., 2000. Enzymes for cereals which do not pose viscosity problems. In: *Proceedings from the third European Symposium on feed Enzymes*, Netherland, p. 7.
- Bedford, M.R., 1996a. The effect of Enzymes of Digestion. *J Appl Poultry Res* 5, 370-378.
- Bedford, M.R., 1996b. Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry *J Appl Poultry Res* 5, 86-95.
- Bedford, M.R., Apajalahti, J., 2000, Microbial interactions in the response to exogenous enzyme utilization, In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 299-314.
- Bedford, M.R., Apajalahti, J., 2001, Implications of diet and enzyme supplementation on the microflora of the intestinal tract, In: Poel, A.F.B.v.d., Vahl, J.L., Kwakkel, R.P. (Eds.) *Advances in nutritional technology 2001*. Wageningen Pers, Wageningen Netherlands, pp. 197-206.
- Bernier, G., Phaneuf, J.B., Filion, R., 1977. [Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Study of the factors favoring the multiplication of *Clostridium perfringens* and the experimental transmission of the disease]. *Can J Comp Med* 41, 112-116.
- Biagi, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F.X., 2006. Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. *J Anim Sci* 84, 370-378.

- Branton, S.L., Lott, B.D., Deaton, J.W., Maslin, W.R., Austin, F.W., Pote, L.M., Keirs, R.W., Latour, M.A., Day, E.J., 1997. The effect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in broiler chickens. *Poult Sci* 76, 24-28.
- Branton, S.L., Reece, F.N., Hagler, W.M., Jr., 1987. Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poult Sci* 66, 1326-1330.
- Brennan, J., Moore, G., Poe, S.E., Zimmermann, A., Vessie, G., Barnum, D.A., Wilson, J., 2001. Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult Sci* 80, 1451-1454.
- Brugère-Picoux, J., Silim, A., 1992, Manuel de pathologie aviaire, Édition Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de Basse-Cour Edition. Imprimerie du Cercle des Élèves de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Alfort, France.
- Brul, S., Coote, P., 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol* 50, 1-17.
- Buchanan, A.G., 1982. Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol* 16, 761-762.
- Callewaert, R., Holo, H., Devreese, B., Van Beeumen, J., Nes, I., De Vuyst, L., 1999. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacilli amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method. *Microbiology* 145 (Pt 9), 2559-2568.
- Cebra, J.J., 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. In: *Am J Clin Nutr.* 1999. 69: 5, 1046S-1051S. 50 ref.
- Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J., Boerlin, P., 2008. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol* 127, 116-127.

- Chumchalova, J., Stiles, J., Josephsen, J., Plockova, M., 2004. Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacilli acidophilus* CH5. *J Appl Microbiol* 96, 1082-1089.
- Collier, C.T., van der Klis, J.D., Deplancke, B., Anderson, D.B., Gaskins, H.R., 2003. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3311-3317.
- Cooper, K.K., Songer, J.G., 2009. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe*.
- Craven, S.E., Blankenship, L.C., McDonel, J.L., 1981. Relationship of sporulation, enterotoxin formation, and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* type A in cooked chicken. *Appl Environ Microbiol* 41, 1184-1191.
- Craven, S.E., Cox, N.A., Bailey, J.S., Cosby, D.E., 2003. Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Dis* 47, 707-711.
- Deraz, S.F., Karlsson, E.N., Hedstrom, M., Andersson, M.M., Mattiasson, B., 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacilli acidophilus* DSM 20079. *J Biotechnol* 117, 343-354.
- Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 84, 634-643.
- Dumonceaux, T.J., Hill, J.E., Hemmingsen, S.M., Van Kessel, A.G., 2006. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 72, 2815-2823.
- Eklund, T., 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J Appl Bacteriol* 54, 383-389.
- Farthing, M.J., 2004. Bugs and the gut: an unstable marriage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 233-239.

- Flores-Diaz, M., Thelestam, M., Clark, G.C., Titball, R.W., Alape-Giron, A., 2004. Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe* 10, 115-123.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot* 65, 1545-1560.
- Fukata, T., Hadate, Y., Baba, E., Uemura, T., Arakawa, A., 1988. Influence of *Clostridium perfringens* and its toxin in germ-free chickens. *Res Vet Sci* 44, 68-70.
- Gholamiandehkordi, A.R., Timbermont, L., Lanckriet, A., Van Den Broeck, W., Pedersen, K., Dewulf, J., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2007. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol* 36, 375-382.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2006a. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacilli sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 108, 1-9.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2006b. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 111, 170-174.
- Gong, J., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R., Chen, S., 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol Lett* 208, 1-7.
- Hale, M.L., Stiles, B.G., 1999. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin using a capture antibody ELISA. *Toxicon* 37, 471-484.
- Hara, Y., Miura, S., Komoto, S., Inamura, T., Koseki, S., Watanabe, C., Hokari, R., Tsuzuki, Y., Ogino, T., Nagata, H., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Ishii, H., 2003. Exposure to fatty acids modulates interferon production by intraepithelial lymphocytes. *Immunol Lett* 86, 139-148.

- Harp, J.A., Chen, W., Harmsen, A.G., 1992. Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum*: the importance of intestinal microflora. *Infect Immun* 60, 3509-3512.
- Hatheway, C.L., 1990. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev* 3, 66-98.
- Hegde, S.N., Rolls, B.A., Coates, M.E., 1982. The effects of the gut microflora and dietary fibre on energy utilization by the chick. *Br J Nutr* 48, 73-80.
- Hofacre, C.L., Beacorn, T., Collett, S., Mathis, G., 2003. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *J Appl Poultry Res* 12, 60-64.
- Hofacre, C.L., Froyman, R., George, B., Goodwin, M.A., Brown, J., 1998. Use of Aviguard, Virginiamycin, or Bacitracin MD against *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis. *J Appl Poultry Res* 7, 412-418.
- Holben, W.E., Feris, K.P., Kettunen, A., Apajalahti, J.H., 2004. GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 70, 2263-2270.
- Hong, H., Pruden, A., Reardon, K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods* 69, 52-64.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59, 171-200.
- Jiang, H.Q., Thurnheer, M.C., Zuercher, A.W., Boiko, N.V., Bos, N.A., Cebra, J.J., 2004. Interactions of commensal gut microbes with subsets of B- and T-cells in the murine host. (Special Issue: Possibilities for active and passive vaccination against opportunistic infections). *Vaccine* 22, 805-811.
- Kaldhusdal, M., Hofshagen, M., Lovland, A., Langstrand, H., Redhead, K., 1999. Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: evaluation of

- preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24, 337-343.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I., Moore, R.J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* 4, e26.
- Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B., Tannock, G.W., 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl Environ Microbiol* 68, 5918-5924.
- Koenen, M.E., Hulst, R.v.d., Leering, M., Jeurissen, S.H.M., Boersma, W.J.A., 2004a. Development and validation of a new in vitro assay for selection of probiotic bacteria that express immune-stimulating properties in chickens in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40, 119-127.
- Koenen, M.E., Kramer, J., Hulst, R.v.d., Heres, L., Jeurissen, S.H.M., Boersma, W.J.A., 2004b. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. *British Poultry Science* 45, 355-366.
- Kondo, F., 1988. In vitro lecithinase activity and sensitivity to 22 antimicrobial agents of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis of broiler chickens. *Res Vet Sci* 45, 337-340.
- Labbe, R.G., 1981. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A in a defined medium. *Appl Environ Microbiol* 41, 315-317.
- Lan, P.T., Hayashi, H., Sakamoto, M., Benno, Y., 2002. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiol Immunol* 46, 371-382.
- Lee, K.W., Everts, H., Beynen, A.C., 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Int J Poult Sci* 3, 738-752.
- Leeson, C.R., Leeson, T.S., Paparo, A.A., 1985, Histology of the organ systems, In: Company, W.B.S. (Ed.) Textbook of histology fifth Edition. Toronto, pp. 332-357.

- Leroy, F., De Winter, T., Adriany, T., Neysens, P., De Vuyst, L., 2006. Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacilli amylovorus* DCE 471. *Int J Food Microbiol*.
- Long, J.R., 1973. Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. *Can J Comp Med* 37, 302-308.
- Lovland, A., Kaldhusdal, M., 1999. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24, 345-351.
- Lovland, A., Kaldhusdal, M., 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian Pathol* 30, 73-81.
- Lovland, A., Kaldhusdal, M., Redhead, K., Skjerve, E., Lillehaug, A., 2004. Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. *Avian Pathol* 33, 83-92.
- Lu, J.R., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J., Lee, M.D., 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 69, 6816-6824.
- Ma, Y.L., Guo, T., Xu, Z.R., You, P., Ma, J.F., 2006. Effect of *Lactobacilli* isolates on the adhesion of pathogens to chicken intestinal mucus in vitro. *Lett Appl Microbiol* 42, 369-374.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D., Wade, W.G., 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 2333.
- Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., De Gussem, K., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2004. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol* 33, 3-7.
- Martin, T.G., Smyth, J.A., 2008. Prevalence of *netB* among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet Microbiol*.

- McDevitt, R., Brooker, J., Acamovic, T., 2006. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *Worlds Poult Sci J* 62, 221-247.
- McDonel, J.L., 1980. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacol Ther* 10, 617-655.
- McReynolds, J.L., Byrd, J.A., Anderson, R.C., Moore, R.W., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Poole, T.L., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., 2004. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poult Sci* 83, 1948-1952.
- Mead, G.C., Adams, B.W., 1975. Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. *Br Poult Sci* 16, 169-176.
- Mitsch, P., Zitterl-Eglseer, K., Kohler, B., Gabler, C., Losa, R., Zimpernik, I., 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poult Sci* 83, 669-675.
- Miwa, N., Masuda, T., Terai, K., Kawamura, A., Otani, K., Miyamoto, H., 1999. Bacteriological investigation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning caused by Japanese food without animal protein. *Int J Food Microbiol* 49, 103-106.
- Miwa, N., Nishina, T., Kubo, S., Atsumi, M., Honda, H., 1998. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *Int J Food Microbiol* 42, 195-200.
- Mollby, R., Holme, T., 1976. Production of phospholipase C (alpha-toxin), haemolysins and lethal toxins by *Clostridium perfringens* types A to D. *J Gen Microbiol* 96, 137-144.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

- Nava, G.M., Bielke, L.R., Callaway, T.R., Castaneda, M.P., 2005. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim Health Res Rev* 6, 105-118.
- Nord, C.E., Mollby, R., Smyth, C., Wadstrom, T., 1974. Formation of phospholipase C and theta-haemolysin in pre-reduced media in batch and continuous culture of *Clostridium perfringens* type A. *J Gen Microbiol* 84, 117-127.
- Norton, R.A., Hoerr, F.J., 1999. Clostridial Diseases of poultry. *Poultry Digest*, 14-20.
- Nurmi, E., Nuotio, L., Schneitz, C., 1992. The competitive exclusion concept: development and future. *Int J Food Microbiol* 15, 237-240.
- Olkowski, A.A., Wojnarowicz, C., Chirino-Trejo, M., Drew, M.D., 2006. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Res Vet Sci* 81, 99-108.
- Park, S.S., Lillehoj, H.S., Allen, P.C., Park, D.W., FitzCoy, S., Bautista, D.A., Lillehoj, E.P., 2008. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis* 52, 14-22.
- Partanen, K.H., Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev* 12, 117-145.
- Patterson, J.A., Burkholder, K.M., 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 82, 627-631.
- Pedersen, K., Bjerrum, L., Heuer, O.E., Wong, D.M., Nauerby, B., 2008. Reproducible infection model for *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Dis* 52, 34-39.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., Tebbe, C.C., 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66, 930-936.

- Piva, A., Casadei, G., Biagi, G., 2002. An organic acid blend can modulate swine intestinal fermentation and reduce microbial proteolysis. *Can J Anim Sci* 82, 527-532.
- Prescott, J.F., Sivendra, R., Barnum, D.A., 1978. The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. *Can Vet J* 19, 181-183.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol* 63, 2355-2360.
- Ragione, R.M.I., Woodward, M.J., 2003. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet Microbiol* 94, 245-256.
- Riddell, C., Kong, X.M., 1992. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis* 36, 499-503.
- Rood, J.I., 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu Rev Microbiol* 52, 333-360.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C., 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64, 4870-4876.
- Shroff, K.E., Meslin, K., Cebra, J.J., 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 63, 3904-3913.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R., Du, Z., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J Appl Microbiol* 100, 296-305.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59, 201-222.

- Stevens, D.L., Maier, K.A., Mitten, J.E., 1987. Effect of antibiotics on toxin production and viability of *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother* 31, 213-218.
- Su, W.J., Waechter, M.J., Bourlioux, P., Dolegeal, M., Fourniat, J., Mahuzier, G., 1987. Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile* in gnotobiotic mice. *Infect Immun* 55, 1686-1691.
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Gholamiandehkordi, A.R., Pasmans, F., Martel, A., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2008. Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.
- Titball, R.W., Naylor, C.E., Basak, A.K., 1999. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* 5, 51-64.
- Titball, R.W., Naylor, C.E., Miller, J., Moss, D.S., Basak, A.K., 2000. Opening of the active site of *Clostridium perfringens* alpha-toxin may be triggered by membrane binding. *Int J Med Microbiol* 290, 357-361.
- Torok, V.A., Ophel-Keller, K., Loo, M., Hughes, R.J., 2008. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74, 783-791.
- Tucker, J.F., Harry, E.G., Laursen-Jones, A.P., 1975. The role of histamine and fish meal in the incidence of gizzard erosion and pro-ventricular abnormalities in the fowl. *Br Poult Sci* 16, 69-78.
- Van Dyke, M.I., McCarthy, A.J., 2002. Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Appl Environ Microbiol* 68, 2049-2053.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol* 33, 537-549.

- Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., Titball, R.W., 2008. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol.*
- Varga, J., Stirewalt, V.L., Melville, S.B., 2004. The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (cpe) regulation in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 186, 5221-5229.
- Watkins, K.L., Shryock, T.R., Dearth, R.N., Saif, Y.M., 1997. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet Microbiol* 54, 195-200.
- Wells, C.L., Maddaus, M.A., Jechorek, R.P., Simmons, R.L., 1988. Role of intestinal anaerobic bacteria in colonization resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7, 107-113.
- Widjoatmodjo, M.N., Fluit, A.C., Verhoef, J., 1995. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 33, 2601-2606.
- Wielen, P.W.J.J.v.d., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B.A.P., Knapen, F.v., 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl Environ Microbiol* 66, 2536-2540.
- Wielen, P.W.J.J.v.d., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., Knapen, F.v., Biesterveld, S., 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb Ecol* 44, 286-293.
- Williams, R.B., 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol* 34, 159-180.
- Williams, R.B., Marshall, R.N., La Ragione, R.M., Catchpole, J., 2003. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol Res* 90, 19-26.

- Wilson, J., 1999. Latest thinking on necrotic enteritis. *International Hatchery Practice* 13, IV-V.
- Wise, M.G., Siragusa, G.R., 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J Appl Microbiol* 102, 1138-1149.
- Zinger, L., Gury, J., Giraud, F., Krivobok, S., Gielly, L., Taberlet, P., Geremia, R.A., 2007. Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb Ecol* 54, 203-216.